

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE PARIS.

THÈSE
PRÉSENTÉE AU CONCOURS D'AGRÉGATION
DU 3 MAI 1909.

(Section d'Histoire naturelle et de Pharmacie)

DES FERMENTS PROTÉOLYTIQUES

ET DES

Produits Pharmaceutiques qui dérivent de leur action

PAR

Maurice JAVILLIER,

PHARMACIEN SUPÉRIEUR,

DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES,

PROFESSEUR DE PHARMACIE ET MATIÈRE MÉDICALE A L'ÉCOLE DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE TOURS.

PARIS

VIGOT Frères, Éditeurs

23, Place de l'Ecole de Médecine, 23

—
1909



Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSE

PRÉSENTÉE AU CONCOURS D'AGRÉGATION

DU 3 MAI 1909.

(Section d'Histoire naturelle et de Pharmacie)

DES FERMENTS PROTÉOLYTIQUES

ET DES

Produits Pharmaceutiques qui dérivent de leur action

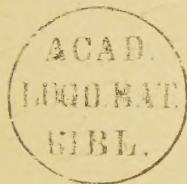
PAR

Maurice JAVILLIER,

PHARMACIEN SUPÉRIEUR,

DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES,

PROFESSEUR DE PHARMACIE ET MATIÈRE MÉDICALE A L'ÉCOLE DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE TOURS.



PARIS

VIGOT Frères, Éditeurs

23, Place de l'Ecole de Médecine, 23

—
1909

JUGES DU CONCOURS

MM. GUIGNARD, *Président*.
BOURQUELOT.
RADAIS.
PERROT.
GRIMBERT.
JADIN.
GRÉLOT.

JUGES SUPPLÉANTS

MM. COUTIÈRE.
GUÉRIN.
GUÉGUEN.
LUTZ.

CANDIDATS

MM. HÉRISSEY.
JAVILLIER.

PLAN DU MÉMOIRE.

INTRODUCTION.

Substances protéiques et Ferments protéolytiques.	1-8
--	-----

PREMIÈRE PARTIE.

Ferments des Protéines.

CHAPITRE I.— Pepsine.	9-93
------------------------------	------

Sous-CHAPITRE I. — Localisation. Méthodes de prépa- ration.	9
--	---

§ 1. Localisation de la pepsine. Propepsine	9
---	---

§ 2. Méthodes de préparation..... ..	12
--------------------------------------	----

a) par autodigestion de muqueuses et concentra- tion	12
---	----

b) par autodigestion de muqueuses et précépita- tion ou entraînement du ferment.....	13
---	----

c) méthodes séparant la pepsine soit de liquides d'autodigestion, soit de suc gastrique pur, par des moyens physiques.....	15
--	----

Sous-CHAPITRE II. — Propriétés physico-chimiques de la pepsine. — Sa composition.	19
--	----

Sous-CHAPITRE III. — Action de la pepsine sur les substances protéiques.	23
A. Conditions de l'activité pepsique	24
§ 1. Température.....	24
§ 2. Réaction ; nature et dose de l'acide	25
§ 3. Influence des composés minéraux et organiques.	29
B. Produits de la digestion pepsique	36
§ 1. Les phases de la digestion pepsique des protéines. Ecole de Kühne	36
§ 2. Méthodes de séparation des produits de la digestion pepsique	43
1° <i>Albumoses</i>	43
a) Séparation des albumoses primaires des albumoses secondaires.....	43
b) Séparation des hétéroprotéoses des protoprotéoses.....	44
c) Albumoses secondaires. Isolement de plusieurs deutéroalbumoses	48
2° <i>Peptones pepsiques vraies. Amphopeptones</i> ..	52
3° <i>Derniers produits de la digestion pepsique</i> ..	56
4° <i>Valeur de la division des produits de digestion pepsique en nombreuses albumoses et peptones. Peptides d'E. FISCHER</i>	60
§ 3. Action de la pepsine sur des substances protéiques autres que des protéines : protamines, histones, caséine, hémoglobine, gélatine, etc.....	63
C. Mesure de l'activité pepsique	69
a) Méthodes basées sur une propriété physique des liquides de digestion	70
b) Méthodes basées sur la mesure de la quantité de substance protéique digérée en un temps donné.....	71
c) Méthodes basées sur la détermination de la quantité de ferment produisant, en un temps donné, un effet déterminé	74

d) Méthodes basées sur la fixation d'acide par les substances protéiques, en présence de pepsine	76
e) Loi d'action de la pepsine ..	77

SOUS-CHAPITRE IV. — Applications pharmaceutiques de la pepsine. 79

§ 1. La pepsine aux Codex français de 1866, 1884, 1908	79
§ 2. Essai des pepsines officinales	81
§ 3. Préparations de pepsine	89

CHAPITRE II. — **Trypsine.** 94-155

SOUS-CHAPITRE I. — Protrypsin et Kinase. Suc pancréatique et extraits pancréatiques. 94

§ 1. Protrypsin et Kinase	94
§ 2. Suc pancréatique et extraits pancréatiques ..	100

SOUS-CHAPITRE II. — Propriétés physico-chimiques de la trypsin. Ses conditions d'activité sur les substances protéiques. 106

SOUS-CHAPITRE III. — Action de la trypsin sur les substances protéiques. 112

A. Marche générale de la digestion tryptique. Schéma de Kühne et Neumeister	112
B. Acides aminés, oxyaminés, diamminés, etc, produits par hydrolyse tryptique des substances protéiques. 114	
a) Comparaison entre les produits de l'hydrolyse tryptique et de l'hydrolyse acide	121
b) Réactions colorées de la tyrosine et du tryptophane, distinction entre les digestions pepsique et tryptique	122
c) Rapidité d'apparition et ordre de succession des acides aminés	124

C. Antipeptones, d'après Kühne, d'après Siegfried. Polypeptides d'E. Fischer.....	126
D. Action de la trypsine sur les peptides. Recherches d'E. Fischer et ses collaborateurs.....	134
E. Faits particuliers relatifs à l'hydrolyse trypsique de quelques substances protéiques autres que des protéines.....	139
SOUS-CHAPITRE IV.— Mesure de l'activité trypsique.	144
SOUS-CHAPITRE V.— Pancréatines officinales.	150
CHAPITRE III. — Produits pharmaceutiques résultant de l'action de la pepsine et de la trypsine. Peptones officinales.	156-169
§ 1. Préparation .. .	156
§ 2. Distinction.....	158
§ 3. Caractères. Essai.....	161
§ 4. Conservation. Emploi.....	166
CHAPITRE IV.— Erepsine.	170-176
§ 1. Extraction du ferment. Localisation.....	171
§ 2. Action sur les substances protéiques, les pro- téoses, les peptides ; conditions d'activité.....	173
§ 3. Spécificité.....	175
CHAPITRE V. — Ferments protéinolytiques des tissus et des organes.	177-188
CHAPITRE VI.— Ferments protéinolytiques des plantes.	189-218
A. Papaïne.....	190
§ 1. Origine et extraction.....	190
§ 2. Conditions d'activité.....	194
§ 3. Produits de la digestion papainique.....	197
§ 4. Applications pharmaceutiques	200
B. Ferments protéinolytiques des graines. Protéase du malt.....	201

C. Ferments protéinolytiques des feuilles, des fruits. Broméline. Plantes carnivores	206
D. Ferments protéinolytiques des champignons et des microbes.....	210
E. Comment classer les protéases végétales.....	214

CHAPITRE VII. — **Appendice à l'étude des ferments
des protéines. L'arginase.**

DEUXIÈME PARTIE.

Ferments des Protéides.

CHAPITRE VIII. — **Ferments des
Paranucléoprotéides.** 224-239

§ 1. Présure, envisagée comme ferment protéolytique	224
§ 2. Caséase.....	235
§ 3. Gluténase	238

CHAPITRE IX. — **Ferments des Nucléoprotéides.**

§ 1. Nucléase	241
§ 2. Guanase et adénase.....	243

TROISIÈME PARTIE.

Ferments des Protéoïdes.

CHAPITRE X. — **Gélatinase.** 247-250

Table alphabétique des matières.....	251
Abréviations bibliographiques.....	255
Addenda et corrigenda	256

INTRODUCTION.

Substances protéiques et ferments protéolytiques.

Des réactifs biologiques qui, chez les animaux et les plantes, effectuent la décomposition des substances protéiques — telle est la définition la plus simple que l'on puisse donner des ferments protéolytiques. — Chez les Animaux qui empruntent à d'autres organismes leurs aliments azotés, ce sont ces ferments qui décomposent les albumines alimentaires dans l'acte de la digestion, les rendent dialysables et assimilables, les scindant en molécules plus simples, susceptibles d'entrer dans le cycle de réactions qui aboutira aux albumines spécifiques de l'organisme considéré.

Chez les Plantes qui puisent tout leur aliment dans le monde extérieur sous forme minérale et font, à partir des éléments ou de combinaisons simples, la synthèse de leurs constituants protéiques, ils ne sauraient intervenir au même titre, sauf sans doute chez les plantes qui, dépourvues de pigments assimilateurs, vivent en saprophytes.

Chez tous les organismes — plantes et animaux — ces ferments président au métabolisme intracellulaire des matières protéiques ; ce sont eux, par exemple, qui, chez

les graines, déterminent la mobilisation des réserves protéiques au moment de la germination.

Ce sont enfin ces ferments qui, dans les organes aseptiquement conservés, provoquent — au moins pour une bonne part — les phénomènes d'autolyse dont ceux-ci sont le siège.

Les substances qu'ils sont appelés à transformer sont très nombreuses, très diverses, et aussi très mal connues.

Il y a moins de dix années, les connaissances positives que nous possédions sur les substances protéiques se réduisaient à peu de chose : composition élémentaire, quelques réactions générales — réactions de coloration ou de précipitation — et quelques corps définis provenant de leur oxydation, comme l'urée et l'acide oxalique, ou de leur hydrolyse, comme la leucine et la tyrosine. Les travaux de SCHÜTZENBERGER, pour remarquables qu'ils fussent, avaient préparé la solution de la question, mais ne l'avaient pas apportée. Disons tout de suite que c'est à M. A. KOSSEL et surtout à M. E. FISCHER que la science doit les progrès que depuis dix années elle a réalisés dans cette direction.

La découverte d'albumines relativement simples comme les protamines, l'emploi des acides forts comme agents d'hydrolyse, l'application de méthodes nouvelles d'isolement des acides aminés, enfin la préparation synthétique des peptides rappelant les peptones d'origine diastasi-que par leurs propriétés, marquent les étapes successives de ces progrès.

L'étude des ferments protéolytiques doit naturellement bénéficier de la lumière qui s'est faite sur toutes ces questions.

Mais si nous commençons à voir un peu plus clair dans leur histoire, à mieux pressentir le mécanisme de leur action, il subsiste sur la plupart des points des obscurités et des incertitudes. Celles-ci pourraient être plus facile-

ment levées si nous avions en main des ferments à l'état de pureté chimique. Mais il n'en est aucun que nous possédions sous cette forme. Il y a plus : la plupart des études faites sur les ferments protéolytiques, et surtout sur les deux plus importants d'entre eux, la pepsine gastrique et la trypsine pancréatique, l'ont été avec des extraits d'organes qui renferment une quantité d'impuretés et des ferments solubles autres que ceux dont on se propose l'étude. Les travaux les plus récents, ceux qui portent non sur des extraits d'organes mais sur des sécrétions physiologiques, offrent plus de garantie et ont effectivement apporté des résultats nouveaux, quelquefois même contradictoires avec les résultats antérieurs. Mais ces sécrétions physiologiques renferment peut-être elles mêmes non une protéase mais plusieurs, si bien qu'il n'est pas certain que nous observions des phénomènes simples d'hydrolyse diastasique mais peut être une superposition de phénomènes dus à une série de diastases agissant successivement.

Pour qui songe à la complexité de la molécule protéique, cette hypothèse est tout à fait séduisante. On sait ce qui se passe dans un domaine voisin, celui des diastases des hydrates de carbone. La dissolution de l'amidon paraît être le fait d'au moins trois diastases, une amylase, une dextrinase, une maltase. La réduction en trois hexoses d'un hexotriose comme le gentianose exige le concours de 2 diastases, l'invertine et la gentiobiase, et M. BOURQUELOT a bien développé cette notion que, pour dédoubler intégralement un polysaccharide en hexoses, il faut autant de ferments (ou d'actes fermentaires), moins un, que le polysaccharide renferme de molécules d'hexoses. Il n'est pas illégitime de penser que des faits du même ordre puissent être mis en évidence à propos de l'hydrolyse diastasique des protéiques.

Mais je sais bien qu'un raisonnement par analogie n'a rien de scientifique et que celui-ci va même à l'encontre

de l'opinion de beaucoup de physiologistes. Aussi je ne le présente que sous forme hypothétique et pour montrer qu'il y a, à l'origine de ces études, une cause possible, sinon probable, de complication.

Tandis que nous connaissons un nombre important de diastases des polysaccharides, que nous sommes arrivés à discerner des diastases différentes pour des polyoses de même composition et ne différant entre eux que par le mode de liaison des sucres qui les constituent, nous ne connaissons qu'un très petit nombre de diastases protéolytiques.

Sous un même nom, sous celui de trypsine en particulier, nous comprenons des ferments très certainement différents les uns des autres, mais nous sommes mal armés pour en faire la distinction.

Celle-ci devra être basée en premier lieu sur les conditions d'action du ferment, surtout sur le taux d'acidité ou d'alcalinité pour lequel son activité est maxima.

C'est ce qu'ont fait, par exemple, M. MESNIL pour l'actinoprotéase, M. FERNBACH pour la protéase du malt, ou M. BERTRAND pour la gluténase.

Cette distinction sera basée ensuite sur la nature des protéiques que la diastase attaque et des produits qu'elle fournit.

Mais les substances protéiques et leurs produits d'hydrolyse sont trop complexes pour que, de ce côté, la distinction des protéases soit chose facile. Le problème est plus simple lorsqu'il s'agit de distinguer les diastases peptolytiques et, à ce point de vue, la méthode, basée sur l'emploi des polypeptides actifs de MM. E. FISCHER et E. ABDERHALDEN, a rendu et rendra d'incontestables services.

Ceci m'amène à toucher à la question de *classification* des ferments protéolytiques. Une seule paraît logique : la classification chimique, j'entends celle qui prend pour base la nature chimique des substances attaquées, puisque nous ignorons entièrement celle des diastases elles-mêmes

Elle doit donc être calquée en quelque sorte sur la classification des matières protéiques. Mais cette dernière même est loin d'être assise et le dernier congrès de physiologie de Heidelberg n'a pas apporté une classification à caractère définitif. Au reste, il nous suffit ici d'une classification ne comportant que les grands groupes et ceci est plus commode.

A la base du groupe, constituant peut-être suivant l'opinion de KOSSEL, le noyau commun à toutes les matières protéiques, sont les **protamines** substances relativement simples, basiques dont MIESCHER découvre le premier type en 1874 dans le sperme du saumon et dont KOSSEL et ses élèves développent l'histoire à partir de 1894.

Puis viennent les **histones**, à caractère nettement basique comme les précédentes et entrant généralement dans des complexes d'ordre plus élevé.

Les **Protéines** (1) renferment les plus typiques des substances protéiques. Ce sont les *albumines* comme celles du blanc d'œuf et du sérum sanguin, les *globulines*, comme le fibrinogène du sang et le myosinogène du muscle, les *édéstines* retirées des semences de Graminées, de Légumineuses, etc.

Les **Protéides** s'écartent des protéines par un caractère essentiel. Hydrolysés par les acides étendus ils se scindent en deux corps : une protéine ou une histone et une deuxième substance dont la nature peut être très variable ; ce sera une substance phosphorée (l'acide phosphorique lui-même : *pseudonucléoprotéides*, groupe des caséines ; une nucléine : *nucléoprotéides* ; une lécithine : *lécithoprotéides*) — une matière colorante à élément métallique, (*métalloprotéides* groupe des hémoglobines) — un sucre ou un sucre aminé (*glucoprotéides*, groupe des mucines).

(1) En Allemagne, le terme Protéine s'applique généralement à l'ensemble des substances protéiques.

Les **Protéoides** constituent un groupe très hétérogène où viennent se ranger des substances très différentes des albumines ; en France, on les appelle albumoïdes, en Allemagne albuminoïdes. Ces noms prêtent à confusion. A l'exemple de M. G. BERTRAND, je les désigne sous ce nom nouveau. Elles comprennent des substances constituant les organes de soutien ou de protection chez les animaux et d'une façon générale les parties résistantes de l'organisme. C'est la matière collagène des fibres conjonctives, l'osséine des os dont dérive la gélatine, la kératine des poils, la fibroïne de la soie, etc.

Réduite à ces grandes lignes, cette classification peut être admise au moins provisoirement. Elle fera place, un jour plus ou moins lointain, à une classification basée sur la structure des matières protéiques, et ce jour là, on pourra donner des ferments protéolytiques eux-mêmes une classification rationnelle.

Actuellement je me bornerai à diviser les ferments protéolytiques en :

- Ferments des Protéines,
- Ferments des Protéïdes,
- Ferments des Protéoides.

Quand cela sera possible, on créera des subdivisions.

Les ferments des protéines comprendront ceux qui s'adressent aux plus complexes des protéines (pepsine, trypsine) ou seulement à leurs produits de transformation (épepsine). Les ferments des protéïdes comprendront les ferments de la caséine et les ferments des nucléoprotéïdes ; ceux-ci comprendront eux-mêmes les ferments de la partie *protéinique* et ceux de la partie *nucléinique* de leur inolécule.

Je ne me dissimule pas ce que cette classification a d'imparfait. Cette imperfection éclatera dès le début quand, dans la partie réservée aux ferments des protéines, nous étudierons, par exemple, l'action de la pepsine considérée

comme ferment « protéinolytique » sur la gélatine qui n'est pas une protéine (au sens où nous l'entendons ici). Mais je suis convaincu que cette imperfection résulte non de la conception elle-même mais de l'état actuel de la science. De toutes façons on voudra bien y voir le témoignage d'une orientation d'esprit dans un sens que je crois juste ; ce sera, si l'on veut, une classification de tendances et rien de plus.

Voilà pour la partie générale, scientifique, de ce mémoire. Mais celle-ci s'allie à la partie appliquée, professionnelle. Certains ferments protéolytiques, pepsine, trypsine, papaïne, sont employés comme agents médicamenteux. Quand, d'autre part, on les fait agir dans certaines conditions sur la viande, la caséine, etc., ils donnent des produits médicaux qui sont des peptones.

L'essai de ces médicaments doit tenir une place importante dans les préoccupations du pharmacien et l'occupera ici. Mais en dehors des ferments employés en thérapeutique comme agents de digestion, d'autres présentent un intérêt réel, quoique moins évident, au point de vue des applications. Telles sont les protéases des organes qui comptent parmi les principes actifs des préparations organothérapiques (1).

Au reste, quelques-uns des ferments étudiés ici ne seraient-ils l'objet d'aucune application qu'il n'y aurait pas lieu de les négliger.

L'éducation scientifique du pharmacien doit briser le cadre des applications purement professionnelles et emprunter aux sciences générales les plus élevés de leurs principes.

L'histoire des ferments protéolytiques remonte déjà loin. On peut la faire débiter en 1752, date des premières observations du physicien et naturaliste français DE RÉAUMUR

(1) La pepsine et la pancréatine, telles que nous les employons en pharmacie, sont d'ailleurs de véritables extraits organothérapiques.

sur la digestion gastrique. Depuis lors, ces ferments ont donné lieu à une littérature considérable ; c'est qu'ils intéressent à la fois la Physiologie et la Chimie biologique, la Pharmacie et la Médecine.

En n'envisageant même que le point de vue chimique et pharmacotechnique, on se trouve en présence d'une masse de documents parmi lesquels il n'est pas toujours facile de faire un choix judicieux. C'est ce choix que j'ai tenté.

PREMIERE PARTIE.

Ferments des protéines.

CHAPITRE PREMIER.

PEPSINE.

SOUS-CHAPITRE PREMIER.

Localisation de la pepsine. — Ses méthodes de préparation.

§ 1. Localisation de la pepsine. — Propepsine.

Bien que les premières études relatives à la digestion pepsique remontent à RÉAUMUR (1752) et à SPALLANZANI (1783), c'est SCHWANN qui découvrit en fait le ferment soluble que nous allons d'abord étudier et qui lui donna le nom de pepsine, du mot grec *πέψις* qui signifie coction, digestion (1834).

La pepsine existe dans les sécrétions gastriques de tous les Vertébrés. Pourtant des différences dans les conditions d'acti-

vité (taux d'acidité, température optima, donnent à penser que les pepsines d'espèces animales différentes ne sont pas identiques (1).

On donne aussi le nom de pepsine à des ferments protéolytiques fonctionnant en milieu acide que sécrètent les glandes digestives foie, hépatopancréas de certains Invertébrés, Crustacés, Gastéropodes (KRUKENBERG) (2), Céphalopodes FREDERICQ (3), JOUSSET DE BELLESME (4), BOURQUELOT (5); elle peut s'y trouver associée à la trypsine (BOURQUELOT). Du parenchyme de diverses espèces d'éponges, KRUKENBERG (6) a extrait un ferment analogue à la pepsine.

Dans des vacuoles à contenu acide s'effectue, chez les Infusoires, la digestion intracellulaire des substances protéiques. (METCHNIKOFF) (7); peut-être contiennent-elles un ferment pepsique.

On a décrit des pepsines végétales; nous les retrouverons plus loin.

Dans quelle mesure tous les ferments désignés sous le nom de « pepsine » se rattachent-ils à la pepsine des mammifères — la seule dont il sera ici question — c'est ce que, pour beaucoup d'entre eux, il est à l'heure actuelle impossible de préciser.

• •

La pepsine est sécrétée par les glandes en tubes ramifiés de l'estomac.

(1) F. KLUG. — Untersuchungen über Pepsinverdauung, *Pflüg. Arch.*, LX, 70, 1895. — A. WRÓBLEWSKI. Zur Kenntniss des Pepsins, *Z. ph. Ch.*, XXI, 1, 1896.

(2) KRUKENBERG. — Der Verdauungsvorgang bei einigen Cephalopoden und Pulmonaten. *Untersuch. d. physiol. Inst. Heidelberg*, II, 2, 1878.

(3) FREDERICQ. — La digestion des matières albuminoïdes chez quelques invertébrés. *Bull. Ac. Roy. de Belgique*, XLVI, 213, 1878.

(4) JOUSSET DE BELLESME. — Recherches sur le foie des mollusques céphalopodes. *C. R.*, LXXXVIII, 304, 1879.

(5) BOURQUELOT. — Recherches sur les phénomènes de la digestion chez les Céphalopodes. *Th. Doct. Sc.*, Paris, 1885.

(6) KRUKENBERG. — Über die Enzymbildung in den Geweben und Gefässen der Evertébraten. *Untersuch. d. physiol. Inst. Heidelberg*, II, 339, 1882.

(7) METCHNIKOFF. — *Zool. Anz.*, I, 387, 1878.

Des cellules qui revêtent la paroi de ces tubes glandulaires, cellules de bordure (1) et cellules principales (2), ce sont les secondes qui sécrètent la pepsine; les premières sécrètent l'acide. Du moins cette différenciation fonctionnelle paraît-elle exister chez les Mammifères. Chez les Vertébrés inférieurs, comme la grenouille par exemple, on ne trouve qu'une seule espèce de cellules et c'est le même élément anatomique qui sécréterait à la fois l'acide et la diastase.

Les glandes à pepsine sont très abondantes dans le grand cul de sac stomacal, elles le sont moins dans la région pylorique.

L'élégante méthode de HAMBURGER (3) permet de déterminer rapidement la richesse relative en pepsine des différentes régions de la muqueuse stomacale.

La muqueuse stomacale ne sécrète pas la pepsine sous la forme de ferment actif mais sous forme d'une proenzyme, d'une *propepsine* (4) qui se rencontre dans les granulations des cellules glandulaires. Cette proenzyme est rapidement transformée en pepsine par les acides dilués.

Les phénomènes histo-physiologiques de la sécrétion sont en dehors de notre cadre et nous étudierons dès maintenant les méthodes d'extraction du ferment.

(1) Dites encore cellules de revêtement, cellules adénomorphes, Belegzellen (HEIDENHAIN).

(2) Dites encore cellules adénomorphes (ROLLET), Hauptzellen (HEIDENHAIN).

(3) H. I. HAMBURGER. — Sur une méthode d'extraction des enzymes et proenzymes de la muqueuse du canal digestif et la détermination de leur distribution topique. *Arch. Néerland. des Sc. exactes et naturelles*, XIII., 428, 1908.

(4) EBSTEIN et GRÜTZNER. — Über Pepsinbildung im Magen. *Pflüg. Arch.*, VIII, 122, 617, 1874.

PODWISSOTSKI. — *Pflüg. Arch.*, XXXIX, 62.

LANGLEY. — On the histology of the mammalian gastric glands and the relation of pepsin to the granules of the chief-cells. *J. of Physiol.*, III, 269, 1881.

LANGLEY et EDKINS. — Pepsin and Pepsinogen. *J. of Physiol.*, VII, 371 1886.

K. GLOESSNER. — Über die Vorstufen der Magenfermente. *Hofm. Beitr.*, I. I, 1901.

§ 2. Méthodes de préparation.

Les méthodes de préparation de la pepsine varient avec le but poursuivi ; les unes sont des *méthodes industrielles* et visent à l'obtention de *pepsines médicinales* répondant aux exigences des pharmacopées, les autres sont des *méthodes de laboratoire* et visent à l'obtention de *pepsines aussi pures* que possible.

Considérons ces méthodes dans leur ensemble.

Depuis les premiers essais de SCHWANN (1) puis de WASMANN (2), il en a été proposé un si grand nombre qu'on ne saurait les citer toutes.

Essayons de classer méthodiquement les plus importantes.

a) Méthodes de préparation de la pepsine par autodigestion de muqueuses et concentration.

Méthode de PETIT (3). — C'est l'une des plus simples ; c'est aussi l'une des meilleures pour la préparation de la pepsine officinale.

On utilise les estomacs de porc, les caillottes de veau ou de mouton. On les lave soigneusement à grande eau, puis la muqueuse est séparée par raclage, hachée et mise à macérer dans quatre fois son volume d'eau distillée additionnée de 5 0/0 d'alcool. On agite toutes les 1/2 heures, puis au bout de 4 heures on filtre les liqueurs et on les évapore à 40° dans des vases plats.

Par ce procédé très simple que l'on pourrait perfectionner en pratiquant l'évaporation à froid et dans le vide, on obtient des pepsines très actives.

Procédé dit anglais. — La méthode que l'on suit dans les laboratoires industriels est très analogue ; elle consiste aussi

(1) SCHWANN. — *Müllers Arch.*, 90, 1836.

(2) WASMANN. — De digestionē animalī. *Diss.*, 1839.

(3) A. PETIT. — Etudes sur la pepsine. Paris 1881.

On trouvera d'anciennes méthodes de préparation, qu'il m'a paru sans intérêt de reproduire ici, dans la thèse de CHASSAING. Etude pratique de la pepsine. *Th. Ph.*, Paris 1887.

en une *autodigestion de muqueuses* suivie d'une évaporation à basse température.

On prend des muqueuses d'estomac de porc ; on les lave pour les débarrasser de leurs impuretés, et on les passe au lami noir. Les muqueuses ainsi traitées sont placées dans un digesteur avec de l'eau distillée et de l'acide chlorhydrique concentré et pur et maintenues à 37°-38° C. On agite fréquemment ; au bout de 6 heures, la dissolution est complète. On suspend alors l'autodigestion, on laisse refroidir et on ajoute du chloroforme et une quantité suffisante d'acide sulfureux pour empêcher la putréfaction. Au bout de 12 à 24 heures, on décante le liquide clair qui recouvre le dépôt et on filtre.

La solution claire filtrée est répartie dans des cuvettes de porcelaine peu profondes et concentrée à une température de 40°-44° C. jusqu'à réduction du volume au 1/3. On filtre de nouveau avec soin et on remet le tout sur des plateaux jusqu'à consistance pâteuse ou dessiccation complète.

Ces méthodes fournissent des pepsines évidemment fort impures, renfermant des proportions importantes de syntonine, d'albumoses et de peptones. On peut les purifier en les dissolvant dans l'eau acidulée et en saturant la dissolution par le sulfate de soude.

Il se fait un volumineux précipité, les peptones restent en dissolution tandis que la pepsine est entraînée. On redissout le précipité dans l'eau, on dialyse la liqueur, et on l'évapore à basse température.

b) *Méthodes de préparation de la pepsine par autodigestion de muqueuses et entraînement ou précipitation du ferment.*

Les méthodes groupées sous ce titre séparent la pepsine soit en l'entraînant dans un précipité (phosphate de chaux, cholestérine), soit en la précipitant par un réactif approprié (sulfate d'ammoniaque, alcool).

Méthode de BRUCKE (1). — Elle a longtemps passé pour excellente, mais en réalité elle ne donne qu'un modeste rendement d'un produit d'activité moyenne.

La muqueuse de l'estomac du porc est mise à digérer à 38° avec de l'acide phosphorique dilué jusqu'à ce que la majeure partie soit dis-

(1) BRUCKE. Vorlesungen über Physiologie, I, 294, 1874.

soute (durée environ huit jours) ; la solution filtrée est neutralisée par l'eau de chaux : il se fait un précipité de phosphate de chaux qui entraîne la pepsine. On remet ce précipité sur un filtre, on le lave à l'eau. On le dissout dans l'acide chlorhydrique faible et on ajoute peu à peu à la liqueur filtrée une solution de cholestérine dans un mélange de 4 parties d'alcool et d'une partie d'éther. La cholestérine vient former à la surface une bouillie blanche qui, agitée avec le liquide, s'empare mécaniquement de la pepsine ; ou la lave avec de l'eau acidulée à l'acide acétique puis avec de l'eau pure et on la traite par l'éther aqueux qui dissout la cholestérine, tandis que la pepsine gagne la couche aqueuse. Celle-ci, épuisée une deuxième fois par l'éther constitue une solution concentrée de pepsine qui abandonne par évaporation à basse température un résidu grisâtre de pepsine.

Méthode de SUNDBERG (1). —

Cet auteur fait macérer la muqueuse broyée avec du sel marin en nature ; il ajoute ensuite assez d'eau pour dissoudre le sel ; au bout de deux à trois jours de contact on filtre, on dialyse ; il reste ainsi un liquide pauvre en substances protéiques et riche en pepsine.

On ajoute du phosphate de soude puis du chlorure de calcium et un peu d'ammoniaque. Le précipité de phosphate de calcium est recueilli, lavé, dissous dans l'acide chlorhydrique dilué et dialysé.

Méthode de KÜHNE (2). —

Des muqueuses d'estomac de porc sont hachées et mises à digérer à l'étuve avec de l'acide chlorhydrique étendu.

Lorsqu'on constate que le liquide ne contient plus qu'un peu d'albumoses, ou le sature de sulfate d'ammonium.

Le précipité d'albumose qui se produit et qui entraîne avec lui la pepsine est exprimé et soumis à une nouvelle digestion avec de l'acide chlorhydrique étendu. Cette opération est renouvelée jusqu'à ce que toutes les albumoses aient été transformées en peptone, non précipitable par le sulfate d'ammoniaque. A ce moment, le sulfate d'ammoniaque ne précipite plus que la pepsine que l'on débarrasse des sels au moyen de la dialyse. On précipite finalement par l'alcool qui doit être éliminé aussi rapidement que possible.

Méthode de VON-WITTICH (3). — Von Wittich a mis à profit la solubilité des diastases dans la glycérine. Il fait digérer la muqueuse avec la glycérine aiguisée d'acide chlorhydrique à 2⁰/₁₀₀.

(1) SUNDBERG. Beitrag zur Kenntniss des Pepsins. Z. ph. Ch. IX, 319, 1885.

(2) KÜHNE ET CHITTENDEN. Ueber die Peptone, Z. f. Biol. XXII, 423, 1886.

(3) VON WITTICH. Pflüg-Arch. ; II, 193, III, 339, V, 435.

La solution obtenue se conserve longtemps, on en peut extraire par l'alcool-éther une pepsine très active.

Méthode de SCHRUMPF (1). — La méthode de cet auteur diffère notablement des précédentes ; au lieu de prendre pour point de départ des extraits de muqueuses, il prépare avec celles-ci un *suc de presse* d'où il extrait la pepsine par entraînement au moyen de cholestérine.

c) *Méthodes séparant la pepsine soit de liquides d'autodigestion de muqueuses soit de suc gastrique pur par des méthodes physiques (refroidissement, dialyse).*

Si actifs que soient les produits obtenus dans les méthodes précédentes, il n'en est pas moins évident qu'ils présentent un vice originel. Un extrait d'organe est tout autre chose qu'une sécrétion physiologique ; aussi les produits obtenus peuvent-ils renfermer à côté de la diastase dont on se propose d'utiliser ou d'étudier les propriétés une ou plusieurs autres protéases que le suc gastrique ne renferme pas et différentes de la pepsine. Aussi les méthodes d'extraction qui prennent le *suc gastrique* pour point de départ présentent-elles, au point de vue de l'étude scientifique de la pepsine, une incontestable supériorité.

Ces méthodes ont été pratiquement applicables dès le jour où l'on a pu par l'emploi des fistules stomacales obtenir avec facilité et en abondance le suc gastrique pur des animaux.

D'autre part, l'emploi de précipitants chimiques n'est pas sans inconvénient. Il en est, comme l'alcool, qui affaiblissent considérablement l'activité de la diastase.

Les méthodes qui sont groupées dans ce troisième paragraphe effectuent la séparation du ferment par un procédé purement physique (refroidissement ou dialyse) et substituent généralement des sucres naturels à des liquides d'autodigestion.

Un des premiers essais est dû à KRASSILNIKOW (2) qui, par

(1) SCHRUMPF. Darstellung des Pepsinfermentes aus Magenschleimhaut. *Hofm. Beitr.*, VI, 396, 1905.

(2) KRASSILNIKOW. *Hoppe Seylers medic. chem. Untersuch.*, 241, 1867. cité d'ap. *Dict. de Würtz*, 2^e St., p. 1146.

dialyse du suc gastrique du chien a obtenu une pepsine très active et relativement pure.

M^{me} SCHOUROW-SIMANOWSKI (1) recueille du suc gastrique sur un chien muni d'une fistule de Pawlow et soumis à l'épreuve du repas fictif. Par concentration dans le vide puis refroidissement à 0°, il se produit un précipité amorphe et granuleux dont la teneur en chlore est constante et dont l'activité protéolytique est très grande. Cette pepsine est acide, elle est soluble dans l'eau et la glycérine et donne la réaction des substances protéiques.

M. A. FROUIN (2) a montré que, lorsqu'on opère avec du suc gastrique *rigoureusement* pur, il ne se produit par refroidissement *aucun* précipité.

Dans le cas observé par M^{me} SCHOUROW-SIMANOWSKI, le suc gastrique employé était souillé par la sécrétion œsophagienne et sans doute aussi par une trace de contenu intestinal. Le précipité obtenu par refroidissement du suc gastrique de chien à fistule gastrique et à œsophage sectionné au niveau du cou est déterminée par une impureté.

Méthode de PEKELHARING (3). --

La muqueuse de 10 estomacs de porc est finement hachée ; on la met à digérer pendant cinq jours à la température de 37° avec 6 litres d'acide chlorhydrique à 0,5 %₀. On filtre ; la filtration est difficile et exige un dispositif spécial ; on dialyse la liqueur filtrée pendant 24 heures.

Il se produit dans la liqueur dialysée (A) un précipité, on recueille ce précipité par centrifugation, on le met en contact pendant une heure à 37° avec 30 à 40^{cc} d'acide chlorhydrique à 0,2 %₀ ; il se dissout à peu près complètement. On filtre à 37°. Le filtrat clair jaunâtre qui se trouble par refroidissement est dialysé pendant 15 à 20 heures. Il se fait un précipité qu'on recueille et dissout à nouveau dans l'acide chlorhydrique à 0,2 %₀.

Une nouvelle dialyse de cette liqueur acide sépare un nouveau précipité qu'on recueille sur un filtre, lave avec très peu d'eau, sèche d'abord entre des feuilles de papier-filtre puis dans l'exsiccateur à acide sulfurique.

(1) SCHOUROW-SIMANOWSKI. Über den Magensaft und das Pepsin bei Hunden. *Arch. exp. Path. u. Ph.*, XXXIII, 336, 1894.

(2) A. FROUIN. Nouvelles observations sur l'acidité du suc gastrique. *C. R. Biologie*, LVI, 584, 1904.

(3) C. A. PEKELHARING. Ueber eine neue Bereitungsweise des Pepsins. *Z. ph. Ch.* XXII, 233, 1894.

Il reste de la pepsine dans le liquide ; pour l'en-retirer, on ajoute de l'acétate basique de plomb et de l'ammoniaque, il se fait un volumineux précipité qu'on recueille et met en contact avec une solution saturée d'acide oxalique ; on filtre ; l'oxalate de plomb reste sur le filtre. On soumet le filtratum (B) à la dialyse pendant 24 à 36 heures. Comme précédemment, il se fait un précipité qu'on soumet au traitement déjà décrit (solution dans l'acide chlorhydrique à 0,2 % à 37° dialyse etc.). On obtient un deuxième produit identique au premier. Le liquide B renferme encore de la pepsine qu'on peut précipiter par le sulfate d'ammoniaque et purifier par le procédé indiqué. On obtient ainsi une troisième fraction identique aux deux premières.

Le rendement est très faible, 15 à 20 centigrammes pour 10 estomacs de porc ; mais le pouvoir digestif de cette pepsine est énorme. Un *millième de milligramme* dissout en 20 heures à 37° un fragment de fibrine plongé dans 6^{es} d'acide chlorhydrique à 0,2 %.

Cette pepsine se présente sous l'aspect d'une poudre jaune peu hygroscopique, peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans les solutions étendues de chlorure de sodium ; elle est soluble également à la température de 37° dans les acides étendus en donnant une solution limpide d'où elle se sépare, floconneuse, dès que le taux d'acide descend au-dessous d'un certain chiffre.

NENCKI ET SIEBER (1) appliquent une méthode analogue à l'extraction de la pepsine du *suc gastrique* recueilli chez un chien à fistule gastrique et œsophagotomisé.

500 c⁵ de ce suc sont dialysés pendant 24 heures en présence d'un volume vingt fois plus grand d'eau distillée. Le contenu du dialyseur devient trouble et son acidité s'abaisse à 0,025 %. Cette liqueur trouble étant maintenue dans les pots à centrifuger pendant 15 heures à 0° commence à se sédimenter, et la centrifugation sépare complètement un précipité adhérent et visqueux.

Si le suc gastrique est soumis à la dialyse dans un courant d'eau et pendant un temps plus long, on voit le précipité formé dans les 24 premières heures se redissoudre, mais il peut être reproduit en acidulant à nouveau à 0,02-0,03 %.

PEKELHARING (2) également a préparé une pepsine très pure au moyen de suc gastrique de chien.

(1) NENCKI ET SIEBER.—Beiträge zur Kenntnis des Magensaftes und der chemischen Zusammensetzung der Enzyme, *Z. ph. Ch.* XXXII, 290. 1901.

(2) PEKELHARING.—Mittheilungen über Pepsin. *Z. ph. Ch.* XXXV, 8. 1902.

Ce suc filtré est dialysé pendant 20 heures sur l'eau distillée à une température peu supérieure à 0°. La solution trouble est centrifugée et le résidu est jeté sur un petit filtre, lavé avec un peu d'eau distillée, pressé, détaché du filtre et desséché dans l'exsiccateur. La liqueur dialysée fournit encore, quand on l'additionne de sulfate d'ammoniaque à 1/2 saturation, un précipité qu'on purifie par dialyse, dissolution dans l'acide chlorhydrique à 0,2 % et nouvelle dialyse.

SOUS-CHAPITRE II.

Propriétés physico-chimiques de la pepsine. — Sa composition.

La pepsine, telle que les méthodes précédemment décrites nous ont appris à la préparer, se présente sous des aspects très variés.

Les procédés qui visent à l'obtention de pepsines aussi pures que possible donnent un produit amorphe, pulvérulent, blanc ou légèrement coloré en jaune; les produits commerciaux, ceux qui intéressent directement le pharmacien, sont *des poudres de couleur jaunâtre, des paillettes translucides ou opaques, des pâtes plus ou moins épaisses*, ces différentes formes dépendant du mode d'évaporation ou de dessiccation.

La pepsine est soluble dans l'eau, dans les solutions étendues de chlorure de sodium, dans les acides dilués.

La pepsine dite pure de PEKELHARING est soluble dans l'acide chlorhydrique à 0,2 % et insoluble dans ce même acide à 0,02 %.

La pepsine est précipitée par les réactifs généraux de précipitation des substances protéiques; elle est précipitée par l'alcool fort.

Est-elle elle-même une substance protéique ?

Pour répondre en connaissance de cause à cette question, il faudrait être sûr d'avoir en main de la pepsine à l'état de pureté chimique. C'est ce que les méthodes, même les meilleures, ne sauraient nous garantir.

Les pepsines de PEKELHARING, de NENCKI, permettent pour-

tant d'apporter une solution, au moins provisoire, à la question (1).

Ces pepsines se comportent comme des substances protéiques. Elles en ont la composition moyenne.

Chiffres de NENCKI et SIEBER moyennes de plusieurs analyses de pepsines extraites par dialyse du suc gastrique de chien :

$$C = 51,26 \quad H = 6,74 \quad N = 14,33 \quad S = 1,5$$

Chiffres de PEKELHARING (idem) :

$$C = 51,99 \quad H = 7,07 \quad N = 14,44 \quad S = 1,63$$

Ces chiffres sont calculés, déduction faite des cendres.

Les pepsines les plus pures laissent en effet à l'incinération un petit résidu minéral.

Celle de NENCKI laisse un résidu moyen de 0 gr. 399 pour 100 grammes.

Celle de PEKELHARING (obtenue par dialyse du suc gastrique) laisse seulement 0,1 de cendres pour 100.

La pepsine, d'après les mêmes auteurs, renferme du chlore. La proportion de cet élément est remarquablement constante. NENCKI indique 0,47 à 0,48 %, PEKELHARING 0,49 %.

D'après M. A. FROUX, la totalité du chlore du suc gastrique est à l'état d'HCl libre.

La pepsine renferme du fer, du moins on en trouve constamment à l'état de traces dans le résidu d'incinération. NENCKI donne comme moyenne 0,16 pour 100 grammes de pepsine.

PEKELHARING confirme la présence de cet élément sans donner de chiffres.

La pepsine renferme-t-elle du phosphore ?

La pepsine de NENCKI en renferme une proportion très variable qui oscille entre 0,07 et 0,14 %, et elle perd une bonne partie de ce phosphore par lavage à l'alcool, lavage qui enlève d'ailleurs à cette pepsine ses propriétés protéolytiques.

(1) Il est évident que ces pepsines dites « pures » ne le sont pas ; l'observation ci-dessus rappelée de FROUX le démontre surabondamment. Il m'a paru cependant que les documents qui suivent ne sont pas dépourvus d'intérêt.

La première pepsine de PEKELHARING était phosphorée ; la dernière (dialyse du suc gastrique du chien) ne l'est plus et n'en est pas moins très activement protéolytique.

Il est difficile de dire à quel groupe de matières protéiques la pepsine peut se rattacher. On a dit l'avoir scindée en une albumose, un nucléoprotéide et une troisième substance phosphorée, peut-être une lécithine (PEKELHARING, NENCKI et SIEBER).

L'hydrolyse du nucléoprotéide donnerait de l'acide phosphorique, des bases xanthiques et un pentose (FRIEDENTHAL (1), NENCKI et SIEBER). Mais ces faits perdent tout leur intérêt si l'on peut enlever à la pepsine son groupe « nucléoprotéique », sans atteindre ses propriétés fermentaires (FRIEDENTHAL et MIYAMOTA (2), et si l'on peut même obtenir une pepsine active sans phosphore (PEKELHARING).

Lorsqu'on chauffe *rapidement* une solution acide de pepsine, préparée d'après PEKELHARING, on obtient un coagulum. Ce coagulum est soluble dans la potasse au centième.

Sa solution alcaline, chauffée cinq minutes au bain-marie, se colore en jaune et, acidifiée par l'acide chlorhydrique, abandonne, avec dégagement d'hydrogène sulfuré, un abondant précipité blanc.

Le corps obtenu dans ces conditions par PEKELHARING a les propriétés d'un acide ; il est difficilement soluble dans les alcalis, soluble dans l'alcool, et donne les réactions du biuret, de Millon, d'Adamkiewicz, xanthoprotéique. Il possède la composition centésimale suivante :

$$C = 50,79 \quad H = 7,02 \quad N = 14,44 \quad S = 1,08$$

PEKELHARING l'appelle acide pepsique (Pepsinsäure). Nous ne savons rien de plus de son histoire chimique.

*
* *

MM. HUGOUNENQ et MOREL (3) ont étudié les produits que fournit par hydrolyse sulfurique, chlorhydrique ou fluorhydri-

(1) FRIEDENTHAL.—Beiträge zur Kenntnis der Fermente. *Engelman Arch.* 181, 1900.

(2) FRIEDENTHAL et MIYAMOTA.—Über die chemische Natur des Pepsins and anderer Verdauungsenzyme. *Ctbl. f. Physiol.*, XV, 785, 1901.

(3) L. HUGOUNENQ et A. MOREL. — *Bulletin de la Société chimique de France* [4^e S.], t. III, 885, 1908.

que la pepsine de porc telle qu'on la prépare dans l'industrie (pepsine dite extractive des pharmacies). Ils ont pu mettre en évidence les composés suivants qui ont été identifiés à l'état cristallin ou sous la forme de dérivés de constitution parfaitement connue et cristallisés :

Tyrosine.....	1,7	0/0	de produit sec
Alanine	3,2	—	—
Valine.....	7,5	—	—
Leucine	11,4	—	—
Phénylalanine	2,2	—	—
Arginine.....	2,	—	—
Pseudo-histidine	0,4	—	—
Lysine	6,5	—	—
Pseudo-lysine de constitution encore inconnue.			
Adénine.....	0,5	—	—
Guanine.....	0,2	—	—
Glucosamine.....	1,4	—	—

Ils n'ont rencontré dans cette pepsine de porc ni glycolle, ni proline, ni acide glutamique, ni acide aspartique, ni xanthine, ni histidine.

SOUS-CHAPITRE III.

Action de la pepsine sur les substances protéiques.

La pepsine est un ferment « protéolytique », c'est-à-dire que certaines conditions physiques et chimiques étant réalisées, elle décompose par hydrolyse les substances protéiques.

Les substances protéiques disons-nous ? Cette expression est très compréhensive et elle l'est sans doute trop, car il n'est pas certain que toutes les actions de protéolyse que l'on attribue à la pepsine et que nous parcourrons dans ce chapitre relèvent bien de ce ferment soluble.

D'autre part, les pepsines que mettent entre nos mains les méthodes de laboratoire sont capables d'actions chimiques très diverses : hydrolyse de substances protéiques très dissemblables comme l'ovalbumine et la gélatine ; caséification du lait, coagulation d'albumoses.

Je ne saurais partager l'avis des auteurs qui voient dans ces multiples actions l'effet d'une série de groupements fonctionnels fixés sur une même molécule, la molécule géante, comme disent les auteurs allemands, de la pepsine. Mais c'est un point de vue que nous retrouverons.

Pour l'instant, nous allons examiner successivement :

- 1° *Quelles sont les conditions d'activité de la pepsine ;*
- 2° *Quels sont les produits de l'activité pepsique ;*
- 3° *Quelles sont les méthodes de mesure de cette activité.*

Nous considérerons l'action de la pepsine sur les substances protéiques (au sens large), mais en faisant abstraction de l'action

présurante qu'on lui attribue à mon sens abusivement et de l'action plastéinogène dont il sera question plus loin.

..

A. Conditions d'activité de la pepsine.

L'activité du ferment dépend de deux facteurs physiques essentiels : la *température* et la *réaction*.

Elle est influencée, activée, arrêtée, ou seulement diminuée par divers composés minéraux ou organiques.

§ 1. *Température.*

Les déterminations faites par divers observateurs de la *température optima* d'action de la pepsine ne sont pas concordantes. C'est que cette température dépend de l'*origine* de la diastase et de sa *proportion*, du taux d'*acidité* et de la *nature de l'acide*, de la *composition minérale et organique* du milieu. Un chiffre donné n'a donc de valeur que pour les conditions expérimentales où s'est placé chaque expérimentateur.

M. PETIT (1) dit que le maximum d'action a lieu à 50°, HAMMARSTEN (2) dit 40°. Ad. MAYER (3) trouve, suivant les conditions expérimentales, 36° milieu acide à 1,5 " d'acide chlorhydrique) et 55° (acidité de 0,5 % d'acide chlorhydrique).

La température optima serait très inférieure à celle-ci pour la pepsine des vertébrés inférieurs. Il n'y a pas lieu d'insister sur ces différences, bien qu'on en ait tiré argument en faveur de la pluralité des pepsines.

La température mortelle n'est pas davantage, et pour les mêmes raisons, fixée avec certitude. Elle est située très peu au dessus de la température optima d'action : Ad. MAYER (3) indique 55 à 60°, BIERNACKI (4) 65°. D'après HARLAY (5) les solutions de

(1) PETIT. — Recherches sur la pepsine. Paris, 1881, p. 7 et 11.

(2) HAMMARSTEN. — Lehrbuch der physiol. Chem., 1891.

(3) Ad. MAYER. — Die Lehre von den chemischen Fermenten, Heidelberg, 1882.

(4) BIERNACKI. — Das Verhalten der Verdauungsenzyme bei Temperaturerhöhung, Z. f. Biol., XXVIII, 49, 1891.

(5) HARLAY. — De l'application de la tyrosinase à l'étude des ferments protéolytiques. Thèse Pharm., Paris 1900.

pepsine perdent de leur activité dès 60° et le ferment est totalement détruit à 68°.

Les ferments, comme on le sait, sont beaucoup plus résistants à la chaleur sèche qu'à la chaleur humide. La pepsine ne fait pas exception à cette règle. Sèche, on peut la chauffer à 100° pendant 4 heures (SALKOWSKI) (1) ou à 110° pendant 1 heure (SCHMIDT) (2) sans qu'elle perde ses propriétés.

D'autre part, elle résiste à de très basses températures ; elle n'est pas détruite par un séjour d'un quart d'heure à —160° (Ad. BICKEL) (3).

§ 2. Réaction.

La pepsine n'est active qu'en milieu acide. Les alcalis la détruisent. Un suc gastrique neutralisé par la soude ou un carbonate alcalin perd ses propriétés protéolytiques. Quand on le réacidule, il ne les recouvre pas complètement et l'activité nouvelle dépend de la durée de la phase d'alcalinité qui a précédé (TICHOMIROW) (4).

Le proferment de la pepsine, le pepsinogène, est beaucoup plus résistant vis-à-vis des alcalis.

Après de longues controverses, il a été établi que l'acide normal du suc gastrique est l'acide *chlorhydrique* (BIDDER et SCHMIDT). La proportion d'acide dans ce suc normal varie avec les espèces : 1 à 3 ‰ chez l'homme, 5 ‰ chez le chat, 4 à 6 ‰ chez le chien.

Il n'y a pas lieu d'entrer ici dans les discussions soulevées à propos de l'état sous lequel l'acide se trouve dans le suc gastrique.

Cl. BERNARD puis M. Ch. RICHER ont admis qu'il se trouve, au moins partiellement, à l'état de combinaison. D'après

(1) SALKOWSKI. — Ueber die Wirkung erhitzter Fermente und das Propepton. *Virch. Arch.*, LXXXI, 552, 1880.

(2) SCHMIDT. — Bemerk. zu Gauthier's Fibringerinnungsversuch. *Ctbl. f. die Med-Wiss.*, XXV, 352, 1880.

(3) Ad. BICKEL. — Notiz über die Resistenz des Pepsins gegen niedrige Temperaturen. *Dtsch. Med. Woch.*, n° 35, p. 1383, 1905, d'ap. *Bioch. Ctbl.*, IV, 368, 1905.

(4) TICHOMIROW. — Zur Frage nach der Wirkung der Alkalien auf das Eiweissferment des Magensaftes. *Z. ph. Ch.*, LV, 107, 1908.

M. FROUIN (1), au contraire, l'acide serait, dans le suc pur, entièrement libre. Il peut être d'ailleurs incidemment associé à d'autres acides, — tel l'acide lactique ou tel autre acide organique, soit que ceux-ci proviennent de fermentations (RICHEL), soit qu'ils aient été absorbés en trop grande proportion pour être immédiatement brûlés. Dans ce dernier cas, on les retrouve en effet dans toutes les sécrétions digestives (FROUIN).

* *

Quelle est la dose d'acide chlorhydrique la plus favorable à la digestion pepsique ?

Ce point a été examiné par un grand nombre d'expérimentateurs : SLIS (2) indique 1,25 ‰, M. DISDIER (3) 1,5 ‰, A. PETIT (4) 1.5 à 3 ‰, HUPPERT et SCHÜTZ (5) 2 ‰.

La discordance de leurs résultats tient surtout à ce qu'ils ont expérimenté sur des substances protéiques différentes.

Voici des expériences récentes de M. ISCOVESCO (6).

M. Iscovesco a expérimenté avec une solution de pepsine commerciale et avec un suc gastrique de chien.

La solution de pepsine est obtenue avec de l'eau légèrement acidulée à l'acide chlorhydrique.

Avant d'être employée, cette solution est dialysée de manière à la rendre absolument neutre aux indicateurs.

On prépare alors des tubes renfermant des cubes aussi égaux que possible d'ovalbumine coagulée par la chaleur et des quantités égales de solution de pepsine.

Ces tubes préparés, on laisse un tube neutre témoin, et dans les autres on ajoute des doses croissantes d'acide chlorhydrique.

M. Iscovesco constate alors que, pour des solutions de pepsine à 1 ‰, la liqueur *neutre* ne digère *pas du tout*. Avec 0,50 et

(1) A. FROUIN. — Sur l'acide du suc gastrique. *C. R. Biologie*, 1899 et Nouvelles observations sur l'acidité du suc gastrique. *C. R. Biologie*, LVI, 584, 1904.

(2) SLIS. — Essai de la pepsine. *Nederl. Tijdschr. voor Pharm. Chem. on Toxic.* Mai 1900, d'ap. *J. Ph. Ch.* [6^e], XII, 278, 1900.

(3) F. DISDIER. — Contribution à l'étude de la digestion pepsique. *Thèse Doct. Ph.*, Paris, 1904.

(4) PETIT. — *Loc. cit.*

(5) HUPPERT et SCHÜTZ. — Ueber eine quantitative Verhältnisse bei der Pepsinverdauung. *Pflüg. Arch.*, LXXX, 470, 1900.

(6) H. ISCOVESCO. — Du pouvoir digestif de la pepsine en rapport avec son acidité. *C. R. Biologie*, LVIII, 282, 1906.

1 $\frac{0}{100}$ d'acide, l'action digestive est également *nulle*. Elle commence à 1,50 d'acide chlorhydrique $\frac{0}{100}$ et le point optimum est situé entre 2 et 3 $\frac{0}{100}$. Au delà, la digestion est retardée, gênée, et à partir de 6 $\frac{0}{100}$ complètement arrêtée.

Avec le suc gastrique de chien, dialysé jusqu'à neutralisation complète, puis acidifié, la digestion ne commence qu'avec 2 $\frac{0}{100}$ d'acide; elle va s'améliorant et augmentant de vitesse jusqu'à atteindre un optimum qui se trouve entre 4 et 6 $\frac{0}{100}$. Elle est ensuite retardée et de plus en plus difficile avec des doses croissantes d'acide et n'arrive à être complètement enrayée que lorsqu'on arrive à une proportion d'acide de 25 $\frac{0}{100}$.

Avec le suc gastrique de porc, les faits sont les mêmes, à cette différence près que la dose paralysante d'acide est beaucoup plus petite que pour le suc gastrique de chien.

Ces doses optima d'acide chlorhydrique n'ont rien d'absolu. Elles varient avec divers facteurs, avec la *nature* et l'*état* de la substance protéique mise en œuvre, avec la *proportion de ferment*, etc.

Du premier point, les résultats discordants des premiers observateurs cités constituent une preuve suffisante.

La dose optima d'acide est plus élevée pour la fibrine que pour l'ovalbumine (A. PETIT), elle s'abaisse encore pour l'ovalbumine coagulée, quand la coagulation de cette albumine par la chaleur a été effectuée en présence d'acide (acide acétique, oxalique, tartrique, azotique) (F. DISDIER).

Du deuxième point une bonne étude est due à MM. ROGER et GARNIER (1). Ces savants ont examiné l'influence des variations *simultanées* de la pepsine et de l'acide chlorhydrique sur la digestion pepsique.

Voici les points essentiels qui se dégagent de leur travail:

1° *La dose optima d'acide varie avec la teneur en pepsine.* Pour une proportion de ferment comprise entre 0,25 et 8 $\frac{0}{100}$, la solution la plus active est celle qui renferme 2,5 d'acide chlorhydrique $\frac{0}{100}$. Quand le taux de pepsine atteint 16 $\frac{0}{100}$, les liquides contenant 2,5 et 5 $\frac{0}{100}$ d'acide chlorhydrique exercent

(1) ROGER et GARNIER. — Influence des variations simultanées de la pepsine et de l'acide chlorhydrique sur la digestion peptique. *C. R. Biologie*, LXI, 314, 1906.

un effet identique. Avec 32 et 64 de pepsine, c'est la solution à 5 ‰ d'acide chlorhydrique qui l'emporte. Avec 128, c'est la solution à 10 ‰.

2° *Un excès d'acide gêne la digestion pepsique et l'effet défavorable de cet excès d'acide est d'autant plus marqué que la teneur en pepsine est moins considérable.*

3° *Un excès de pepsine peut entraver la digestion ; « il existe pour le ferment comme pour l'acide une dose optima et cette dose varie considérablement suivant la proportion d'acide chlorhydrique. Pour des quantités faibles d'acide chlorhydrique de 0,31 à 0,62 ‰, la proportion de pepsine la plus favorable est de 8 ‰.*

Quand l'acide augmente, le taux de pepsine s'élève : avec 1,25 d'acide chlorhydrique il faut 16 de ferment, avec 2,5 il en faut 32, avec 5 il en faut 64, avec 10 ou 20 le meilleur résultat correspond à 128.

Quand la proportion d'acide s'abaisse et devient minime, un excès de pepsine favorise la digestion.

Si le liquide ne contient que 0,16 d'acide chlorhydrique ‰, l'effet le plus marqué sera obtenu avec 64 de pepsine. Si le taux tombe à 0,08, la meilleure digestion s'observe dans le tube renfermant 128.

Ainsi, aux doses moyennes d'acide, il faut des doses moyennes de pepsine. Quand la proportion d'acidité s'élève ou s'abaisse en dehors des limites physiologiques, on doit, pour obtenir les meilleurs effets, utiliser un excès de ferment. »

• •

L'acide chlorhydrique est l'acide qui, physiologiquement, sensibilise la pepsine ; mais les acides minéraux et organiques peuvent, pour la plupart, lui être substitués dans les expériences *in vitro*.

Lorsqu'on étudie à ce point de vue les différents acides, on voit qu'à quantités moléculairement équivalentes, c'est l'acide chlorhydrique qui favorise le plus la protéolyse par la pepsine.

Après lui, se classent les acides oxalique, nitrique, sulfurique, puis les acides tartrique, citrique, lactique, formique,

malique, enfin, dans une dernière série, les acides acétique, butyrique, valérianique (d'après LARIN) (1).

Bien que beaucoup d'auteurs : MAYER, PETIT, MORACZEWSKI, HAHN, Sjöqvist, etc., se soient occupés de l'action des différents acides sur la digestion pepsique, il n'y a pas d'intérêt à rapporter tous ces travaux que des méthodes expérimentales différentes rendent non comparables.

Il faut considérer non seulement la nature de l'acide, mais encore sa proportion. Il existe, pour chacun d'eux, une proportion optima.

Voici quelques chiffres empruntés au travail de M. PETIT.

Ce chimiste a trouvé que la proportion d'acide, qui, à 50°, produit en 12 heures l'effet maximum sur la fibrine, est :

Pour l'acide	chlorhydrique.	3	0/100
— —	bromhydrique.	5 à 10	—
— —	sulfurique.....	5 à 10	—
— —	phosphorique.	5 à 10	—
— —	formique.....	10	—
— —	oxalique.....	20 à 40	—
— —	lactique.....	20	—
— —	tartrique.....	10 à 40	—
— —	citrique.....	20 à 40	—

L'acide phosphorique vitreux est inactif L'acide acétique n'a manifesté aucune activité à des doses allant de 20 à 40 pour mille.

Ne nous arrêtons pas à relever les chiffres différents de ceux-ci que d'autres expérimentateurs ont trouvés. Ces chiffres varient dans des limites assez larges avec plusieurs facteurs dont le principal est, comme je l'ai dit à propos de l'acide chlorhydrique, la nature et l'état de la substance protéique utilisée.

*
* *

§ 3. *Influence des composés minéraux et organiques sur la digestion pepsique.*

L'étude de l'influence que les divers composés minéraux et organiques exercent sur la digestion pepsique présente, à des

(1) LARIN. — Peptonisation bei Vertretung der Salzäure durch andere Säuren. *Arb. aus dem med. Chem. Lab. der Univ. zu Tomsk.*, I, 1903, d'ap. *Bioch. Ctbl.*, I, 484, 1903.

titres divers, un grand intérêt. Le chimiste y trouve des faits capables d'expliquer certains points du processus de protéolyse ; le physiologiste se place, au cours de cette étude, dans des conditions expérimentales plus proches des conditions naturelles, où interviennent toujours, en dehors des substances réagissantes, un grand nombre de composés minéraux et organiques. Le médecin y trouve des indications pour l'emploi de certains agents thérapeutiques et le pharmacien des documents relatifs aux associations médicamenteuses et à la préparation des médicaments à base de pepsine.

Aussi, les travaux faits avec des objectifs si variés sont-ils très nombreux, mais aussi de valeur très inégale et conduits avec des techniques assez diverses pour n'être pas aisément comparables. Je me bornerai donc ici à les condenser en n'insistant que sur ceux pouvant offrir quelque intérêt général ou professionnel.

Les composés minéraux. — M. A. PETIT a étudié l'influence de divers sels. Les essais étaient faits, en milieu chlorhydrique, à 3 ‰ avec cinq centigrammes de pepsine commerciale, et de la fibrine en quantité très inférieure à celle que la dose de pepsine employée pouvait dissoudre.

Voici les résultats obtenus résumés en un tableau :

	Doses inactives Millièmes	Doses qui retardent	Doses qui arrêtent
NaCl....	10 à 80	»	160
K Br.....	10 à 80	»	»
K I.....	10 à 80	»	»
SO ⁴ Mg...	10 à 160	»	»
NH ⁴ Cl...	10 à 40	»	»
SO ⁴ Cu..	10 à 40	»	»
SO ⁴ Zn....	10 à 40	»	»
PO ⁴ HNa ³ .	4	10	20
MgCl ²	2 à 4	8 à 12	16 à 20
Fe Cl ³	2 à 40	»	»
SO ⁴ Fe....	2 à 20	»	»

Ces chiffres n'ont pas de valeur absolue.

Ils ne sont valables que pour les conditions expérimentales où l'auteur s'est placé. Si l'on augmente, par exemple, la proportion de pepsine, les doses retardatrices s'élèvent. On peut

dire pourtant que des quantités déjà notables de sels neutres, 4 à 8 $\frac{0}{10}$, ne gênent pas la digestion pepsique.

On trouve, épars dans la littérature, d'autres essais relatifs à l'action des sels neutres ; citons ceux de GRÜTZNER (1), d'A. SCHMIDT (2), de WOHLBERG (3), de KLUG (4), de MANN (5), de PFLEIDERER (6), de PONS (7). Arrêtons-nous un instant sur ceux de SCHÜTZ et de LEVITES.

SCHÜTZ (8) compare l'action empêchante des anions et des cations : l'action d'arrêt des anions est bien plus forte que celle des cations. En série descendante, ceux-là se rangent ainsi : rhodanates, acétates, sulfates, nitrates, iodures, bromures, chlorures. Ket Na viennent en première ligne, puis à peu près également NH^+ , Mg, Sr, Ba, Ca. Il n'y pas de relation entre le pouvoir d'arrêt des sels sur la protéolyse et leur pouvoir précipitant vis à vis des substances protéiques. Il semble donc que ce soit sur la pepsine bien plus que sur la matière protéique que s'exerce leur action inhibitrice.

LEVITES (1) fait agir sur de la fibrine sèche ou de l'ovalbumine cristallisée du suc gastrique de chien additionné de quantités connues de divers sels. Il dose après un temps donné l'azote passé en dissolution ; il trouve ainsi que LiCl , NaCl , KCl , CaCl_2 , SrCl_2 , KI , Na_2SO_4 , etc. exercent une action d'arrêt et d'autant plus grande que la proportion est plus élevée.

Comme SCHÜTZ, il trouve que l'action empêchante est due surtout aux anions, celle des métaux restant relativement faible.

(1) GRÜTZNER. — Notiz über einige ungeformte Fermente des Säugethierorganismus. *Pflüg. Arch.*, XII, 285, 1874.

(2) A. SCHMIDT. — Ueber Beziehungen des Kochsalzes zu thierischen Fermentations processus. *Pflüg. Arch.*, XIII, 93, 1876.

(3) WOHLBERG. — Einfluss einiger Salze und Alkaloïde auf die Verdauung. *Pflüg. Arch.*, XXII, 291, 1880.

(4) KLUG. — Beitr. zur Pepsinverdauung. *Pflüg. Arch.*, LXV, 330, 1896.

(5) MANN. — Pepsinverdauung. *Diss. Erlangen*, 1897.

(6) PFLEIDERER. — Ein Beitrag zur Pepsin und Labwirkung. *Pflüg. Arch.*, LXVI, 605, 1897.

(7) A. PONS. — Digestion peptique de l'ovalbumine additionnée au préalable de diverses substances. *Arch. int. de Pharm. et de Thérap.*, XVII, 247, 1907.

(8) J. SCHÜTZ. — Ueber die Hemmung der Pepsinwirkung durch Salze. *Hofm. Beitr.*, V, 406, 1904.

L'iode et le brome sont des paralysants de la pepsine. L'acide borique est tout à fait inactif. Les acides arsénieux et arsénique sont activants à très petites doses et les effets sont peu marqués aux doses élevées (A. PETIT).

L'influence des colloïdes inorganiques a été étudiée par L. PINCUSOHN (1). Tous ceux qu'il a expérimentés (Au, Pt, Ag, As, Bi, Sr, Cu, Ag, $\text{Fe}^2\text{O}^3\text{H}^3$) se sont montrés défavorables et l'action empêchante a été surtout marquée pour le sesquioxyde de fer et pour les métaux colloïdaux préparés par d'autres voies que la voie électrique.

Les composés organiques. — Ils ont donné lieu à un très grand nombre d'essais; nous ne les noterons pas tous mais seulement ceux qui portent sur des corps utilisés comme antiseptiques dans les laboratoires, ou, en pharmacie, comme médicaments ou véhicules dans les préparations de pepsine.

Le chloroforme n'est défavorable à la digestion pepsique qu'à doses élevées; à petites doses, il serait favorisant (BERTELS (2), DUBS (3).

L'iodoforme à dose antiseptique ne diminue pas l'activité du ferment (BIRK (4), VAN DE VELDE) (5). Au sujet du toluène, les avis sont partagés; il paraît abaisser, mais peu, l'activité pepsique (A. GROBER) (6).

L'alcool introduit dans une digestion pepsique artificielle diminue l'activité du ferment: cette diminution d'activité, faible pour des doses d'alcool inférieures à 4 ‰, augmente progressivement avec celles-ci et la digestion complète devient impossible en présence de 8 à 10 ‰ d'alcool.

(1) L. PINCUSOHN. — Beeinflussung von Fermenten durch Kolloïde: Wirkung von anorganischen Kolloïden auf Pepsin. *Bioch. Zeitschr.*, VIII, 387, 1908.

(2) BERTELS. — Ueber den Einfluss des Chloroforms auf die Pepsinverdauung. *Virch. Arch.*, CXXX, 497, 1892.

(3) DUBS. — Der Einfluss des Chloroforms auf die künstliche Pepsinverdauung. *Virch. Arch.*, CXXXIV, 519, 1899.

(4) S. BIRK. — Ueber den Einfluss von Kreosot, Iodoform, Salol, Chinin, Chlorcalcium, und Chlormagnesium auf die Magenverdauung. *Disserl. Erlangen*, 1904.

(5) VAN DE VELDE. — Ueber die Anwendung von Antiseptica bei Untersuchungen über Enzyme. *Bioch. Zeitschr.*, III, 315, 1907.

(6) A. GROBER. — Ueber die Wirkung gewisser Antiseptica (Toluol, etc.) auf das Pepsin. *Pflüg. Arch.*, CIV, 109, 1904.

Ces chiffres ne sont donnés ici que comme des approximations ; le degré alcoolique n'est pas seul en jeu et il importe aussi de considérer le rapport de la quantité d'alcool à la quantité de ferment (P. THIBAUT) (1).

Mise en contact avec de l'alcool la pepsine perd partie ou totalité de ses propriétés protéolytiques, l'atténuation de son activité étant d'autant plus profonde que le rapport alcool sur ferment est plus grand, que le titre alcoolique est plus élevé et que le temps de contact est plus prolongé.

C'est pour n'avoir pas tenu un compte assez précis des facteurs en jeu et avoir mesuré l'activité fermentaire par des méthodes différentes, que les auteurs qui se sont occupés de cette question, ont publié des résultats discordants.

D'après A. PETIT (2), une solution de pepsine à 20 % conserve entièrement ses propriétés digestives. M. CHASSAING (3) trouve qu'une pepsine (de titre 80) conserve son activité dans de l'alcool à 20° après 6 mois de contact.

M. BARDET (4) trouve que l'altération de la pepsine ne débute que dans un milieu à 25 % d'alcool, tandis que M. THIBAUT trouve déjà sensible l'altération dans les milieux à 12,5 % d'alcool et très forte dans ceux à 20 %. Nous aurons à retenir ces faits à propos des applications pharmaceutiques de la pepsine.

Les alcools à poids moléculaire plus élevé que l'alcool éthylique sont plus nocifs que celui-ci (LIROSSIER) (5).

M. E. LABORDE (6) a examiné l'influence de quelques alcools à fonction simple ou complexe. Il donne comme favorisants : l'alcool isobutylique, la glycérine, l'acide malique, l'alcool mé-

(1) P. THIBAUT. — Etude sur les préparations officinales de pepsine. *Thèse Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1902.

(2) A. PETIT. — *Loco citato*.

(3) CHASSAING. — Etude pratique de la pepsine. *Thèse Pharm.*, Paris 1887.

(4) BARDET. — *Bull. de la Soc. de Thérapeutique* (2^e S.), XIV, 98, 1887.

(5) LIROSSIER. — Influence comparée des principaux alcools de fermentation sur l'action des diastases. *C. R. Biologie*, I, 887, 1899.

(6) E. LABORDE. — Influence de quelques alcools à fonction simple ou complexe sur la digestion des albuminoïdes par la pepsine ou la trypsine. *C. R. Biologie*. LI, 821, 1899.

thylique ; comme retardateurs, les alcools éthylique et propylique, les acides lactique et tartrique, la mannite, le glucose.

Sont encore des agents plus ou moins retardateurs de l'activité pepsique, l'aldéhyde formique (BLISS et NOVY (1), le chloral, l'aldéhyde benzoïque, l'éther ordinaire, les acides benzoïque, tannique, salicylique, l'émétique, les tartrates sodico et ferrico-potassiques (A. PETIT).

Le phénol est retardateur (A. PETIT) ; le thymol serait inactif, au moins à doses faibles (A. GROBER) (2). La créosote est très empêchante (BIRK (3), SAILER et FARR) (4).

Les sucres retardent plus ou moins la digestion pepsique, le maltose beaucoup, le lactose très peu (SAILER et FARR).

L'antipyrine et l'antifébrine sont faiblement retardatrices.

Les sels de quinine, strychnine, morphine sont sans action, au moins aux doses médicinales (A. PETIT, voir aussi WROBLEWSKI) (5).

La caféine et la théobromine ont une action favorisante (WROBLEWSKI), tandis que les infusions de thé ou de café retarderaient la digestion pepsique (SCHULTZ-SCHULZENSTEIN (6).

La saccharine est un activant, quelle que soit la dose de pepsine (ROGER et GARNIER) (7).

C'est un fait général que les produits d'une réaction diastasique se comportent comme des paralysants de cette réaction.

Les produits de la décomposition pepsique des protéiques, les albumoses et peptones ne font pas exception à cet règle (SH. LEA) (8).

Bien que les amino-acides ne soient pas, au moins physiolo-

(1) BLISS et NOVY. — Die Wirkung von Formaldehyd auf Enzyme. *J. exp. Med.*, IV, 47, 1899.

(2) GROBER. — *Loco citato*.

(3) BIRK. — *Loc. cit.*

(4) SAILER et FARR. — Studies in the natural and artificial inhibition of peptic digestion. *Americ. J. of the Med. Sc.*, CXXXIII, 113, 1907.

(5) WROBLEWSKI. — Zur Kenntnis des Pepsins. *Z. ph. Ch.*, XXI, 1, 1895.

(6) SCHULTZ-SCHULZENSTEIN. — Einfluss von Kaffee und Thee auf künstliche Verdauung. *Z. ph. Ch.*, XVIII, 131, 1893.

(7) ROGER et GARNIER. — Influence de la saccharine sur la digestion peptique. *Arch. d. Méd. exp.*, XIX, 497, 1907.

(8) SH. LEA. — Vergleichende Studien über künstliche und natürliche Verdauung. *J. of physiol.*, XI, 234, 1890.

giquement (voir plus loin), des produits normaux de l'activité pepsique, on peut rappeler ici leur action qui est nettement retardatrice, celle-ci devant être rapportée pour une bonne part à la saturation de l'acide chlorhydrique actif par la fonction basique des amino-acides (JASTROWITZ) (1). A propos de l'action d'arrêt qu'exercent les produits de la digestion pepsique sur la pepsine elle-même, se greffe une question très importante; la même question peut d'ailleurs se poser pour tous les ferments solubles. S'agit-il bien d'une action inhibitrice des produits réactionnels sur la pepsine ou cet arrêt n'est-il pas plutôt le témoignage d'une usure progressive du ferment? Ceci est peu conforme à l'idée qu'on se fait souvent d'une diastase, agent catalysateur qui ne se détruit pas en agissant. Mais en ce qui concerne la pepsine, de récentes expériences de SPINÉANU (2) ne paraissent pas favorables à cette conception.

D'après cet expérimentateur, aux mémoires duquel il nous faut renvoyer pour les détails techniques, la pepsine s'épuise au fur et à mesure qu'elle agit. La protéolyse est une action chimique dans laquelle la pepsine intervient comme un réactif prenant part à la réaction chimiquement et non catalytiquement.

Enfin, pour clore la liste, longue bien qu'incomplète, de substances empêchantes que nous venons de parcourir, il faut ajouter, au moins pour mémoire, que certains liquides de l'organisme, certains sucs d'organes jouissent de propriétés d'arrêt vis à vis de diverses actions diastasiques.

On attribue ces actions d'arrêt à des substances spécifiques, à des antiferments ou antidiastases. De tels anticorps ont été signalés pour la pepsine (HAHN) (3).

Lorsque d'autre part on injecte à un animal des solutions de ferments, on constate que le sérum de cet animal acquiert la propriété de retarder ou même d'empêcher les réactions diastasiques correspondantes.

(1) JASTROWITZ. — Die Hemmung der peptischen Verdauung infolge Bindung freier Salzsäure durch amphotere Aminokörper. *Bioch. Zeitschr.*, II, 157, 1906.

(2) SPINÉANU. — Recherches expérimentales sur le rapport entre la catalyse et la fermentation. Coefficient dynamique des ferments solubles. *Rivista sti intelor Medicale*. I, 243, 377, 1908.

(3) HAHN. — Zur Kenntniss der Wirkung des extravaskulären Blutes. *Bert. Klin. Woch.*, XXXIV, 499, 1897.

On interprète le fait en disant que l'organisme a réagi par la production d'antidiastases. SACHS (1) le premier a obtenu une antipepsine.

B. Produits de la digestion pepsique.

Les conditions de l'activité pepsique bien connues, nous sommes en mesure d'étudier comment celle-ci se manifeste et quels sont les produits qu'elle fournit.

Dans ce but, faisons donc *in vitro* une expérience dont le schéma est celui-ci : on introduit, dans un vase approprié, de la fibrine fraîchement essorée, de l'eau distillée et de l'acide chlorhydrique en quantité telle que l'acidité du milieu soit d'environ 2,5 pour 1.000.

Notons à ce propos une propriété de la fibrine que nous n'avons pas encore eu l'occasion de signaler. Lorsqu'on plonge cette substance dans une liqueur acide, elle fixe l'acide, même à la température ordinaire : si la fibrine est en quantité suffisante, elle peut fixer la *totalité* de l'acide. Il se fait une véritable combinaison, si stable qu'on pourrait laver à l'eau la substance protéique sans qu'elle perdît son acide. Or si l'on ajoutait de la pepsine à un mélange (fibrine + acide + eau) qui aurait perdu son acidité par suite de la fixation de l'acide par la protéine, on verrait qu'il ne se fait *aucune* digestion (2). Il est donc indispensable que les quantités réciproques de fibrine, eau et acide soient convenablement calculées.

Pour fixer les idées, disons donc que nous serons dans de bonnes conditions en plongeant, par exemple, 100 grammes de fibrine fraîche essorée dans 1.000 grammes d'eau additionnés de 7 gr. 50 d'acide chlorhydrique officinal (3).

On porte le tout au B. M. ou à l'étuve réglée à + 50°. Quand flacon et contenu sont en équilibre de température avec le milieu on ajoute Q. S. de pepsine, soit, par exemple, 1 gramme d'une bonne pepsine médicinale.

(1) SACHS. — Ueber Antipepsin. *Fortschr. d. Medic.*, XX, 425, 1902.

(2) H. LEO. — Ueber die Wirkungsweise von Salzsäure und Pepsin bei der Eiweissverdauung, *Z. ph. Ch.* XLVI, 286.

(3) Cet acide renferme 33 gr. 65 HCl pour 100 grammes.

Voici alors ce que l'on observe. On voit la fibrine qui se gonfle puis qui se fluidifie à l'exception d'un faible résidu. On assiste donc à une dissolution progressive de la protéine. En même temps le liquide devient de plus en plus fluide. Si de temps en temps, on en prélève une petite quantité et si l'on filtre ces prises d'essai successives, on voit qu'elles filtrent de plus en plus facilement et que le liquide passe de plus en plus clair.

Si on examine ces prises d'essai au polarimètre, on voit que le pouvoir rotatoire du mélange va baissant progressivement.

Si on les chauffe et si on les additionne d'acide azotique, on constate qu'à un moment donné elles ne coagulent plus par la chaleur et ne précipitent plus par l'acide. Ceci nous apprend déjà que le phénomène observé n'est pas une simple dissolution, un simple changement d'état physique de la fibrine, mais un changement plus profond qui la transforme en substances ne possédant plus certaines des réactions de la protéine initiale.

Il y a en effet dislocation de la matière protéique primitive qui est morcelée en fragments de grosseur moléculaire progressivement moindres. Le mécanisme de cette dislocation, c'est une hydrolyse, une fixation d'eau. Du moins admet-on qu'il est le seul mécanisme qui entre en jeu ; a priori cela n'est pas certain, et l'on serait en droit d'en demander une bonne démonstration expérimentale.

Quelles substances dérivent de la dislocation de la molécule d'albumine ? Comme cette molécule est volumineuse et compliquée, ses produits de dédoublement pourront être nombreux et, au moins au début de la protéolyse pepsique, encore très complexes. On a réuni les substances qui résultent de cette protéolyse sous le nom de *protéoses*. MIALHE (1) les désignait sous le nom d'*albuminoses*, LEHMANN (2) sous celui de *peptones* ; mais de ces deux expressions, la première n'est plus guère employée et la deuxième a un sens plus restreint. Nous nous en tiendrons à l'expression de *protéoses*, mais il faut la définir et c'est ici que les difficultés commencent.

(1) MIALHE. — Mémoire sur la digestion et l'assimilation des matières albuminoïdes. C. R. XXIII, 260-1846.

(2) LEHMANN, — Lehrbuch der physiol. Chemie, 2 Aufl. Leipzig, 1853.

En fait, cette expression ne saurait s'appliquer à une substance définie, elle s'applique au mélange de corps qui résultent de l'hydrolyse pepsique : comme de plus cette expression englobe les produits d'hydrolyse provenant de matières protéiques très diverses ; on voit que non seulement elle ne s'applique pas à un mélange de composition déterminée, mais à toute une série de mélanges analogues, différents les uns des autres au moins par les proportions de leurs constituants, mais présentant pourtant quelques caractères communs.

Prises en bloc ces substances se différencient des protéines primitives en ce qu'elles *ne sont plus coagulables* par la chaleur, mais elles donnent encore les principales réactions de coloration et de précipitation des matières protéiques.

Pour mieux définir cet ensemble complexe, il faut le démembrer. Dans ce but on a recours à différentes méthodes de précipitation par des sels neutres alcalins ou des sels de métaux lourds.

Il y a environ dix années, les chimistes s'en tenaient aux notions successivement développées par MEISSNER ¹, SCHMIDT, MÜHLEIM et surtout KÜHNE et ses élèves, CHITTENDEN, NEUMEISTER.

Ces notions étant depuis longtemps classiques, je me bornerai à les résumer sans en suivre le développement historique.

Lorsque, dès le début de l'action pepsique, on sature l'acidité du liquide en expérience avec du carbonate de soude, on voit se faire un précipité. Ce précipité est un produit de transformation que l'acide seul est susceptible de produire, sans intervention de la diastase (BRÜCKE). On désigne ce produit sous le nom de *syntonine* ou *parapeptone* (MEISSNER). C'est une acide-albumine.

(1) Les mémoires de MEISSNER relatifs à cette question ont paru dans : *Zeitschr. für rat. Medizin*, t. VII, VIII, X et XIV (1859 à 1862).

Les mémoires de SCHMIDT-MÜHLEIM ont paru de 1878 à 1884 dans divers périodiques : *Archiv. f. Anat. u. Physiol.*; *Pflügers Archiv.*, *Virchow's Archiv.*, etc.; ceux de KÜHNE dans *Zeitschr. f. Biologie et Verhandl. d. naturhist. med. Vereins zu Heidelberg*; ceux de CHITTENDEN dans les mêmes périodiques et *J. of Physiology*; ceux de NEUMEISTER, au moins les principaux, dans *Z. f. Biologie*. Voir aussi son *Lehrbuch der phys. Ch.*, 1897 (Iéna).

Au bout d'un certain temps de digestion, on ne peut d'ailleurs plus produire ce précipité et la substance protéique est toute entière transformée en ce que MEISSNER désignait en bloc sous le nom de *peptone*.

Si à l'ébullition on sature de sulfate d'ammoniaque, d'abord en milieu neutre, puis en milieu alcalin, enfin en milieu acide, le mélange résultant de la réaction diastasique, il se fait un précipité. Ce précipité recueilli, il reste une liqueur qui fournit encore avec intensité certaines réactions colorées des substances protéiques et en particulier la réaction du biuret et la réaction xanthoprotéique. On a ainsi divisé les produits de l'hydrolyse en deux parts, d'un côté un ensemble de corps *précipitables par le sulfate d'ammoniaque* à saturation, de l'autre un ensemble de corps *non précipitables dans les mêmes conditions*.

Aux premiers on réserve le nom d'*albumoses*, aux seconds celui de *peptones*.

Il est permis de se demander quelle est la valeur de cette séparation, si c'est même bien une séparation au sens où nous l'entendons d'habitude en chimie. DUCLAUX faisait déjà sur ce point des réserves fort judicieuses et ce que nous savons aujourd'hui des produits de dédoublement des protéiques, légitime entièrement ces réserves. La précipitabilité ou la non précipitabilité par les sels est en relation, non avec la complexité plus ou moins grande de ces produits, mais avec la présence ou l'absence de tel ou tel groupement dans leur molécule. Nous y reviendrons. Pour l'instant, nous sommes obligés de nous en tenir à ces méthodes, il faut les considérer comme ayant un caractère essentiellement provisoire.

Le caractère de non précipitabilité par le sulfate d'ammoniaque n'est pas le seul qui appartienne aux peptones ; nous en verrons d'autres plus tard ; disons seulement, pour l'instant, que par l'ensemble de leurs caractères elles paraissent plus éloignées des albumines primitives que les albumoses, de sorte que l'ordre de succession paraît être le suivant :

Protéine $\longrightarrow$ syntonine $\longrightarrow$ albumose $\longrightarrow$ peptone.

Si l'on considère la peptone comme le terme final de la digestion pepsique (nous aurons à rechercher s'il en est bien réelle-

ment ainsi), on définira la pepsine : « *le ferment soluble qui, en milieu acide, liquéfie et peptonise les substances protéiques.* »

.*.

Ce schéma paraît simple, mais il ne faut pas oublier que ces mots, syntonine, albumose, peptone, désignent, non pas des individus chimiques, mais des mélanges.

Voici d'ailleurs une première complication. D'observations antérieures de MEISSNER, de SCHÜTZENBERGER, et de leurs observations personnelles portant surtout sur la digestion trypsique, KÜHNE et CHITTENDEN ont déduit que la molécule primitive d'albumine se comporte dans ses dédoublements comme si elle était constituée de deux parties inégalement attaquables par les diastases digestives, l'une se disloquant rapidement pour arriver par digestion trypsique au terme extrême d'hydrolyse représenté par les acides aminés, l'autre se dégradant moins aisément, ne donnant pas d'amino-acides sous l'influence de la trypsine, mais seulement une peptone, une « antipeptone ».

La première partie de la molécule protéique constitue l'hémigroupe, la seconde l'antigroupe. Si l'on transporte cette conception dans l'étude de la digestion pepsique, on est amené à penser que les deux fragments de la molécule protéique ne se disloquant pas du même pas, il y a des albumoses provenant de l'hémigroupe, des albumoses provenant de l'antigroupe et de même des héli et des antipeptones pepsiques.

Mais ceci est un peu théorique et pratiquement, au moins en ce qui concerne les peptones, on ne saurait distinguer ce qui provient de l'héli ou de l'antigroupe et l'on désigne, avec KÜHNE, la peptone pepsique sous le seul nom d'*amphopeptone*.

Mais poursuivons notre expérience, nous avons séparé l'albumose de la peptone. L'albumose est un mélange, la peptone est un mélange. De chacun de ces mélanges il faut faire l'analyse immédiate.

Pour séparer les divers corps constituant l'albumose, KÜHNE est ses élèves ont recours à des différences de solubilité dans l'eau ou les sels.

Lorsque l'on traite la solution d'albumose par le chlorure de sodium à saturation, on produit un précipité. Ce précipité est

constitué par des *albumoses dites primaires*, et les *albumoses dites secondaires* restent dans la liqueur.

Le précipité redissous dans le chlorure de sodium étendu et dialysé se sépare en deux portions :

L'*hétéro-albumose* insoluble dans l'eau pure froide ;

La *proto-albumose* soluble dans le même solvant.

La liqueur dialysée puis traitée par le sulfate d'ammoniaque à saturation abandonne les albumoses secondaires (*deutéro-albumoses*).

Albumoses	primaires précipitées par le chlorure de sodium à saturation.	Hétéroalbumoses : <i>insolubles dans l'eau pure froide, mais solubles dans les solutions salines diluées.</i>
		Protoalbumoses : <i>solubles dans l'eau pure, dans les solutions salines diluées.</i>
	secondaires non précipitées par le chlorure de sodium à saturation.	Deutéroalbumoses : <i>solubles dans l'eau, solubles dans les solutions salines étendues.</i>

Les albumoses primaires (*propeptones* de Meissner) sont caractérisées par trois réactions depuis longtemps connues sous le nom de *réactions propeptoniques*.

1° Elles précipitent par l'acide azotique en solutions salines diluées ; le précipité est soluble dans un excès d'acide, il se dissout par la chaleur et reparaît par refroidissement.

2° Elles précipitent par le ferro-cyanure de potassium et l'acide acétique ; le précipité est soluble à chaud et reparaît par refroidissement.

3° En additionnant une solution de propeptone d'un volume égal de solution saturée de chlorure de sodium et d'un excès d'acide acétique, il se fait un précipité également soluble à chaud et reparaissant par refroidissement.

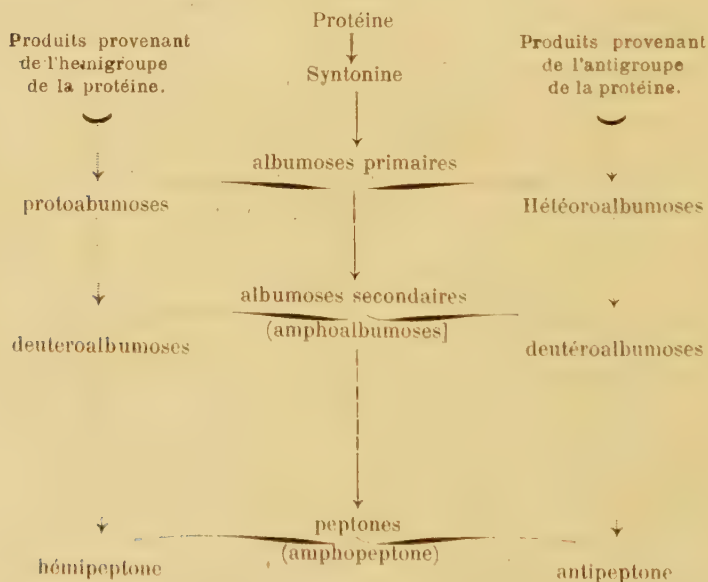
Les hétéroalbumoses, ou hétéroprotéoses, sont insolubles dans l'eau pure.

NEUMEISTER admet que les hétéroprotéoses dérivent surtout

de l'antigroupe de la substance protéique, les protoprotéoses dérivant plutôt de l'hémigroupe. Une observation de SPIRO, confirmée par différents expérimentateurs, témoigne d'une différence fondamentale entre hétéro et proto albumoses ; en hydrolysant une hétéro albumose retirée de la peptone de Witte, il a trouvé que celle-ci donnait surtout de la *leucine* et du *glycocolle*, la protoalbumose correspondante donnant surtout de la *tyrosine* et ne fournissant *pas de glycocolle*.

Les albumoses secondaires (*deutéroalbumoses*, ou *amphoalbumoses*) sont solubles dans l'eau et les solutions salines étendues, elles ne donnent pas les réactions propeptoniques ou ne les donnent pas nettement ; elles ne sont pas précipitées de leurs solutions par le chlorure de sodium à saturation ; elles le sont incomplètement par le chlorure de sodium à saturation et l'acide acétique ajouté à raison de 30 %.

Le schéma suivant synthétise les faits d'après les vues de KÜHNE et de NEUMEISTER :



La valeur d'un tel schéma est tout à fait relative, et cela pour deux raisons : d'abord les substances qui figurent sur un tel

tableau ne dérivent pas régulièrement les unes des autres, comme il le donne à comprendre; en fait, il se forme, *dès le début de la digestion pepsique*, des substances répondant aux caractères des deutéroalbumoses, des peptones et peut-être même des corps abiurétiques (1).

D'autre part, les hétéroalbumoses, les protoalbumoses et les deutéroalbumoses ne sont définies que par des caractères en somme contingents, puisque ce ne sont que des caractères de plus ou moins grande solubilité dans l'eau ou les sels neutres.

La preuve en est, dans ce fait, qu'il suffit de changer la nature des agents précipitants ou leur proportion, pour aboutir à des groupements plus nombreux ou différents.

C'est ce que nous montrera l'examen de plus récents travaux.

*
* *

1° ALBUMOSES.

a) *Séparation des albumoses primaires et des albumoses secondaires.*

La séparation des albumoses et des peptones reste toujours basée sur l'insolubilité des premières, la solubilité des secondes dans le sulfate d'ammoniaque.

Nous verrons d'ailleurs plus loin le caractère artificiel de cette séparation.

Mais chacun des deux groupes a subi d'assez nombreux remaniements.

Pour séparer les albumoses primaires des albumoses secondaires, S. FRÄNKEL (2) a préconisé l'emploi du sulfate de cuivre qui précipite seulement les albumoses primaires.

(1) C'est-à-dire ne donnant plus la réaction du biuret. Voici en quoi consiste cette réaction : à la solution aqueuse d'une matière protéique on ajoute II ou III gouttes de SO_4Cu à 1 %, puis un excès de soude caustique; il se produit une coloration variable avec la matière protéique, depuis le violet jusqu'au rouge violacé. Les peptones donnent une teinte rose pourpre.

(2) S. FRÄNKEL. — *Über die Spaltungsprodukte des Eiweisses bei der Verdauung. Sitz.ber. der. K. Akad. d. Wiss. in Wien*, CX, II, 6, 243, 1897 et *Monatshefte f. Chemie*, XIX, 819, 1898.

O. FOLIN (1) substitue l'acétate au sulfate de cuivre ; la combinaison cuivrique des albumoses primaires n'étant pas entièrement insoluble dans l'eau, on complète la précipitation par addition d'alcool ($1/4$ du volume de la liqueur).

PICK (2) a montré que le sulfate d'ammoniaque à $1/2$ saturation ne précipite que les albumoses primaires ; il suffit alors d'ajouter à une solution d'albumoses un volume égal de solution saturée de sulfate d'ammoniaque pour précipiter ces albumoses.

b) Séparation des hétéroprotéoses des protoprotéoses.

La méthode de KÜHNE et CHITTENDEN, basée sur l'insolubilité des hétéroprotéoses dans l'eau pure froide, n'offre que bien peu de garantie. L'insolubilité de l'hétéroprotéose dans l'eau froide est loin d'être complète, comme l'avait d'ailleurs observé NEUMEISTER (3), et sa solubilité se trouve augmentée par la présence de protoprotéose.

Méthode de PICK (4). — PICK, après avoir vainement essayé de les séparer par précipitation fractionnée au moyen du sulfate d'ammoniaque, a donné une méthode de séparation basée sur l'emploi de l'alcool.

La solution d'albumoses neutralisée est traitée pendant 3 à 4 heures au bain-marie dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux par 2 volumes d'alcool à 95° ; il se produit un précipité assez abondant, floconneux qu'on sépare du liquide clair. La liqueur alcoolique est évaporée à sec au bain-marie. Le produit précipité par l'alcool est purifié par une série de dissolutions dans l'eau bouillante et de reprécipitations par le sulfate d'ammoniaque, puis par l'alcool ; il correspond à l'hétéro-albumose de KÜHNE.

(1) O. FOLIN. — Ueber die Spaltungsprodukte der Eiweisskörper, *Z. ph. Ch.*, XXV, 152, 1889.

(2) PICK. — Untersuchungen über die Proteinstoffe. Ein neues Verfahren zur Trennung von Albumosen u. Peptonen, *Z. ph. Ch.*, XXIV, 246, 1897.

(3) NEUMEISTER. — Bemerk. zur Chemie der Albumosen und Peptone, *Z. f. Biol.*, N. F. V., 292, 1887.

(4) PICK. — Zur Kenntnis der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins, *Z. ph. Ch.*, XXVIII, 219, 1899.

Le produit, soluble dans l'alcool à 60°, recueilli par évaporation du dissolvant, est purifié par une méthode analogue; il correspond à la *proto-albumose* de KÜHNE.

L'*hétéroalbumose* se gonfle dans l'eau froide et ne s'y dissout que très peu; elle est soluble dans l'eau bouillante d'où elle se précipite par refroidissement. Elle se précipite en flocons par addition d'alcool (dès 30 % environ). L'acide azotique à 20 %, ajouté goutte à goutte, fait naître un précipité floconneux insoluble dans un excès de réactif, mais se dissolvant à chaud et reparaissant par refroidissement.

La *protoalbumose* est soluble dans l'eau froide, soluble dans l'alcool même à 80°; elle est plus soluble dans l'alcool dilué que dans l'eau.

L'acide azotique à 20 %, ajouté goutte à goutte, donne un faible trouble qu'un léger excès d'acide fait disparaître. Ce trouble disparaît également quand on chauffe et reparaît par refroidissement. Ces 2 albumoses (hétéro et proto) ne donnent pas les réactions d'ADAMKIEWICZ (1) et de MOLISCH (2).

L'*hétéroalbumose* de PICK a la composition centésimale suivante :

C = 55,12 H = 6,61 N = 17,98 S = 1,22 O = 19,07

La *protoalbumose*, la suivante :

C = 55,64 H = 6,80 N = 17,66 S = 1,21 O = 18,69

Pour 100 d'azote (3), il y a dans l'*hétéroalbumose* :

Azote amidé	Azote diaminé	Azote monoaminé
6,45	38,93	57,40

(1) Lorsqu'on ajoute une substance protéique à un mélange contenant 1 partie SO_4H_2 concentré et 2 parties acide acétique concentré, il se fait une coloration rouge-violet (ADAMKIEWICZ). En fait, cette réaction est due aux traces d'acide glyoxylique que renferme généralement l'acide acétique (HOPKINS et COLE). Cette réaction est liée à la présence du noyau tryptophanique (HOPKINS et COLE).

(2) Si, à une solution d'une substance protéique, on ajoute quelques gouttes de solution alcoolique d' α naphthol, puis de l'acide sulfurique concentré, on obtient une coloration violette qui devient jaune par addition d'alcool, d'éther ou de potasse. Cette réaction serait liée à la présence d'un noyau d'hydrate de carbone (MOLISCH).

(3) Déterminé sous ses trois formes par la méthode d'HAUSSMANN. Ueber die Vertheilung des Stickstoff im Eiweissmolekül. *Z. ph. Ch.*, XXVII, 95, 1899.

et dans la protoalbumose :

7,14

25,42

68,17

L'hétéroalbumose renferme donc bien plus de diamino azote que la protoalbumose.

Par hydrolyse chlorhydrique, l'hétéroalbumose de Pick fournit de la leucine et du glycocolle ; la protoalbumose de la tyrosine, un peu de leucine, pas de glycocolle.

Par la potasse fondante l'hétéroalbumose ne fournit ni indol ni scatol, la protoalbumose donne dans les mêmes conditions une odeur intense d'indol et de scatol. Par digestion pepsique, l'hétéroalbumose et la protoalbumose, l'une et l'autre lentement attaquées, fournissent des deutéroalbumoses et des peptones. La trypsine dédouble promptement la protoalbumose avec formation de leucine et de tyrosine, de corps précipitables par l'eau bromée et l'acide phosphotungtique, tandis qu'elle n'attaque que très lentement et très incomplètement l'hétéroalbumose.

Méthode SIEGFRIED-ADLER. — ADLER² applique à la séparation des 2 albumoses primaires l'une de l'autre, la méthode utilisée par son maître SIEGFRIED pour la séparation des peptones.

Cette méthode repose sur l'emploi de l'alun de fer et d'ammoniaque comme agent de précipitation.

A la solution d'albumoses primaires additionnée de 5 % de sulfate d'ammoniaque on ajoute de l'alun de fer ammoniacal, jusqu'à cessation de précipité en évitant d'introduire un excès de réactif. Il se fait un précipité jaune clair, qu'on presse, lave soigneusement avec une solution de sulfate d'ammoniaque à 5 %, met en suspension dans l'eau et sépare de l'oxyde de fer par l'ammoniaque concentrée. On purifie par une nouvelle précipitation. On sépare l'acide sulfurique par la baryte, l'excès de baryte par le carbonate d'ammoniaque et finalement on évapore à sec dans le vide. On a ainsi une première fraction A. De la liqueur primitive on extrait une deuxième fraction B par saturation avec de l'alun de fer ammoniacal solide.

Le deuxième précipité correspond à l'hétéroalbumose de Pick, le premier à la protoalbumose.

(1) ADLER RUDOLF. — Die Heteroalbumose und Protoalbumose des Fibrins. Ein Beitrag zur Kenntnis der primären Produkte des Eiweissabbaues. *Inaug. Dissert., Leipzig*, 1907.

Hétéroalbumose d'ADLER. — Composition centésimale :

C = 49,78 H = 6,37 O = 26,43 N = 15,97 S = 1,45

Pouvoir rotatoire : $[\alpha_D] = -67,36$.

Elle précipite quand on ajoute à sa solution un volume égal d'alcool. Elle donne faiblement la réaction de MILLON (1), elle ne donne pas la réaction de MOLISCH.

Protoalbumose d'ADLER. — Composition centésimale :

C = 50,18 H = 6,64 O = 24,62 N = 16,85 S = 1,71

Pouvoir rotatoire $[\alpha_D] = -71,73$.

Elle est soluble dans l'alcool à 50 %.

Elle ne donne pas de précipité permanent par l'acide nitrique. Elle ne donne qu'un léger louche avec l'acétate neutre de plomb. Réaction de MILLON positive, réaction de MOLISCH négative.

Les déterminations d'azote faites par la méthode d'HAUSMANN modifiée par SIEGFRIED donnent les résultats suivants :

Hétéroalbumose d'ADLER. —

Azote amidé	Azote diaminé	Azote aminé
10,78	29,29	60,86

Protoalbumose d'ADLER. —

7,44	36,12	52,60
------	-------	-------

Enfin la protoalbumose d'ADLER donne, sous l'influence de l'anhydride carbonique et en présence des bases alcalino-terreuses un carbamate analogue à ceux que SIEGFRIED a obtenus avec les amino-acides de la série du glycocole, avec les peptones et la sérum-albumine. L'hétéroalbumose ne fournit pas cette réaction.

ADLER considère sa protoalbumose et son hétéroalbumose comme des corps définis et purs. Ce seraient les mêmes

(1) Cette réaction consiste en la coloration rouge que les substances protéiques donnent lentement à froid, rapidement à chaud, avec le réactif de MILLON (solution de mercure dans l'acide azotique contenant un peu d'acide azoteux).

qu'obtiennent par leurs procédés respectifs KÜHNE, FOLIN (1), PICK et les différences qu'on peut relever dans leurs propriétés seraient attribuables à leur inégal état de pureté.

c) *Albumoses secondaires. Isolement de plusieurs deutéroalbumoses.*

D'après l'école de KÜHNE étaient considérés comme *deutéroalbumoses* les produits de digestion pepsique précipitables par le sulfate d'ammoniaque à saturation, mais non précipitables par le chlorure de sodium ou le sulfate de magnésium à saturation.

Tandis que les albumoses primaires avaient été scindées en deux fractions, les deutéroalbumoses n'avaient subi aucun fractionnement, bien qu'elles fussent assurément constituées par un mélange de corps voisins.

PICK, un des premiers, chercha à les fractionner. Il eut recours à une méthode indiquée par HOFMEISTER et appliquée par lui ou ses élèves, KANDER, POHL, LEWITH, REYE à la séparation des substances protéiques : la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammoniaque.

Le principe de la méthode est le suivant : soit une solution de protéoses ; on l'additionne progressivement de sulfate d'ammoniaque ; à un moment donné, la liqueur se trouble ; c'est la limite inférieure de précipitation d'une première fraction ; en continuant les affusions de sel ammoniacal, vient un moment où il ne se précipite plus rien ; on a atteint la limite supérieure de précipitation de la fraction I. Celle-ci isolée, on reprend l'addition de sulfate d'ammoniaque ; la liqueur reste claire jusqu'à un moment donné où naît un précipité. C'est la limite inférieure de précipitation d'une fraction II, etc.

Ayant déterminé entre quelles limites de concentration saline se forment des précipités quand l'on traite dans ces conditions des solutions de peptone de Witte diversement concentrées, de réaction neutre, alcaline, acide, PICK isole de celle-ci quatre fractions. La première est obtenue en mélangeant à une solu-

(1) PICK. *Loco cit.*, Z., *ph. Ch.*, XXIV, 246, 1897.

tion à 5 % de cette peptone un volume égal de solution saturée de sulfate d'ammoniaque. Cette portion renferme la totalité des *albumoses primaires* (proto et hétéro).

La deuxième fraction est obtenue en ajoutant à la solution séparée du précipité I la moitié de son volume de solution saturée de sulfate d'ammoniaque, de façon que la liqueur soit aux 2/3 saturée de sel.

La troisième fraction est obtenue par saturation de la liqueur séparée du précipité II par du sulfate d'ammoniaque pur en poudre.

La quatrième résulte de l'addition à la liqueur séparée du précipité III de 1/10 de solution de sulfate d'ammoniaque acidulée par l'acide sulfurique. Cette fraction IV est d'ailleurs très petite.

Les précipités II, III, IV constituent des *deutéroalbumoses* que Pick appelle albumoses A, B, C.

Ces deutéroalbumoses présentent un ensemble de réactions qui paraissent témoigner du passage progressif des albumoses primaires aux peptones.

Voici quelques-unes de ces réactions :

Acide azotique.....	{	A — trouble en présence de chlorure de sodium à saturation.
		B — trouble en présence de chlorure de sodium à saturation.
		C — légère opalescence.
Chlorure de sodium, puis acide acétique.....	{	A — trouble
		B — trouble faible.
		C — pas de trouble.
Ferrocyane acétique.....	{	A — trouble léger.
		B — pas de trouble.
		C — idem.
Sulfate de cuivre étendu...	{	A — trouble.
		B — pas de trouble.
		C — idem.
Acide trichloroacétique....	{	A — précipité abondant.
		B — précipité soluble à chaud.
		C — simple opalescence disparaissant à chaud.

Iodure double de potassium et de mercure.....	}	A — fort précipité insoluble dans l'acide chlorhydrique.
		B — fort précipité soluble dans un grand excès d'acide chlorhydrique.
		C — précipité soluble dans un léger excès d'acide chlorhydrique.

Les trois deutéroalbumoses donnent les réactions de MILLON, d'ADAMKIEWICZ, du biuret.

A renferme du soufre en proportion notable. B en renferme peu, C n'en renferme pas. B donne parmi ses produits d'hydrolyse acide une matière sucrée (c'est probablement de la glucosamine).

Il est intéressant de noter que LANGSTEIN (1) a de son côté obtenu plus tard dans la digestion pepsique de la sérum-albumine une glycoalbumose.

*
* *

F. UMBER (2) a appliqué la technique de PICK au fractionnement des albumoses provenant de la digestion pepsique de substances protéiques préparées dans un état de pureté aussi grand que possible.

Il a opéré avec de l'ovalbumine préparée à l'état cristallisé d'après la méthode de HOFMEISTER (3), avec de la sérum-albumine cristallisée préparée d'après la technique de GÜRBER (4) et de la sérum-globuline séparée du sérum de sang de cheval par la méthode de précipitation fractionnée au sulfate d'ammoniaque utilisée par KANDER et REYE (5).

Dans cette étude, UMBER a séparé des liquides digestifs de chacune de ces substances. 1° une fraction correspondant aux albumoses primaires, 2° trois fractions correspondant aux

(1) LANGSTEIN. — 'Weitere Beiträge zur Kenntnis der aus Eiweisskörpern abspaltbaren Kohlehydrate. *Hofm. Beitr.*, VI, 349, 1905.

(2) F. UMBER. — De Spaltung des krystallinen Eier- und Serum-Albumins sowie des Serumglobulins durch Pepsinverdauung. *Z. ph. Ch.* XXV, 258, 1898.

(3) HOFMEISTER. — Ueber jodirtes Eieralbumin. *Z. ph. Ch.*, XXIV, 1897.

(4) GÜRBER. — Krystallisation des Serumalbumins. *Stzber. d. phys. med. Ges. zu Würzburg*, 1894, cité d'ap. UMBER.

(5) KANDER. — Z. Kenntnis der Eiweisskörper des Blutserums. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, T. XXVI, cité d'ap. UMBER.

deutéroalbumoses, A B-C de PICK ; enfin deux peptones que nous retrouverons plus tard.

Par l'ensemble de leurs réactions de précipitation et de coloration, ces diverses fractions correspondent de façon assurément remarquable avec les fractions isolées par PICK de la peptone de WITTE.

C'est un fractionnement analogue que réalisa F. ALEXANDER (1) parmi les produits de digestion pepsique de la caséine préparée d'après la méthode de HAMMARSTEN.

*
* *

Au sulfate d'ammoniaque on peut substituer pour le fractionnement des albumoses d'autres sels : l'acétate de potassium et mieux, le sulfate de zinc.

BÖMER (2) a montré qu'une solution saturée de sulfate de zinc précipite les albumoses aussi bien que le sulfate d'ammoniaque. BAUMANN et BÖMER (3) ont vu que la précipitation est complète quand on sature à froid de sulfate de zinc en poudre la solution d'albumoses acidifiée. ZUNZ (4) a tenté de séparer les diverses fractions d'albumoses contenues dans la peptone de WITTE, par précipitation fractionnée au moyen de sulfate de zinc. Ce savant a d'abord déterminé les limites inférieures et supérieures de précipitation par le sulfate de zinc de chacune des albumoses préparées par la méthode de PICK.

A vrai dire, dans quelques cas, ces zones de précipitation empiètent un peu les unes sur les autres, de sorte que la méthode, lorsqu'on l'applique à la séparation des albumoses, ne saurait être rigoureuse. D'autre part, ces limites inférieures et supérieures de précipitation changent quelque peu avec la réaction neutre ou acide du liquide. Quoiqu'il en soit, la méthode a permis à l'auteur de séparer de la peptone de WITTE une série de précipités sensiblement identiques à ceux que PICK a

(1) FRANZ ALEXANDER. — Zur Kenntnis des Caseins und seiner peptischen Spaltungsprodukte. *Z. ph. Ch.*, XXV, 411, 1898.

(2) A. BÖMER. — Zinksulfat, ein Fällungsmittel für Albumosen. *Zeitsch. f. anal. Chemie*, XXXIV, 562.

(3) K. BAUMANN et A. BÖMER. — Ueber die Fällung der Albumosen durch Zinksulfat. *Z. für Unters. d. Nahrungs- und Genussmittel*, I, 106, 1898.

(4) E. ZUNZ. — Die fractionirte Abscheidung der peptischen Verdauungsprodukte mittelst Zinksulfat. *Z. ph. Ch.*, XXVII, 219, 1899.

obtenus au moyen du sulfate d'ammoniaque, leur correspondant nettement par l'ensemble de leurs caractères physiques et leurs réactions de coloration et de précipitation. Elle a même permis à ZUNZ de discerner une fraction d'albumose intermédiaire entre les albumoses primaires et la deutéro-albumose A.

Ces cinq albumoses (une primaire, quatre secondaires A α , A β , B, C) l'auteur, faisant en cela un travail parallèle à ceux d'UMBER et d'ALEXANDER, les a retrouvées dans les produits de digestion pepsique de l'ovalbumine, de la sérumglobuline et de la caséine.

La supériorité de la méthode au sulfate de zinc sur la méthode au sulfate d'ammoniaque réside surtout en ce fait qu'elle permet de déterminer, par une série de dosages d'azote, comment à un moment donné de la digestion pepsique, cet élément est réparti sous les formes variées des différentes albumoses et peptones, et comment varie cette répartition au cours du processus digestif (1).

2° PEPTONES PEPSIQUES VRAIS (AMPHOPEPTONES).

Lorsque, du liquide de digestion pepsique d'une protéine on a éliminé, par l'une des méthodes que nous avons étudiées (2), les albumoses, il reste dans ce liquide la « *peptone vraie* » ou « *amphopeptone* » de КИХЕ. Cette amphopeptone constituerait le produit terminal de la digestion pepsique.

L'amphopeptone se distingue des albumoses par un ensemble de caractères :

Elle ne précipite pas par le sulfate d'ammoniaque à saturation et à l'ébullition, quelle que soit la réaction du milieu.

Elle n'est pas précipitée par l'acide azotique, même après saturation de la solution par le chlorure de sodium.

Elle n'est pas précipitée par les iodures doubles, si ce n'est

(1) E. ZUNZ. — Ueber den quantitativen Verlauf der peptischen Eiweiss-spaltung. *Z. ph. Ch.*, XXVIII, 132, 1899.

(2) D'autres mémoires, et quelques-uns importants, ont été publiés sur cette question complexe de la séparation des diverses albumoses. Il faut au moins signaler les nombreux mémoires de SCHRÖTTER, parus sous le titre : Beitr. z. Kenntniss der Albumosen in *Monatshefte f. Chemie*, XIV, 612 (1893), XVI, 609 (1895), XVII, 199 (1896), XIX, 211 (1898).

en présence d'une grande quantité d'un sel très soluble (CaCl^2 , $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$, $\text{SO}^4\text{Zn}\dots$).

L'amphopeptone donne nettement la réaction du biuret et faiblement la réaction xanthoprotéique. Elle ne renferme pas de soufre.

Elle est dialysable.

L'amphopeptone est retirée du liquide privé d'albumoses par précipitation au moyen d'alcool fort (école de KÜHNE). HOFMEISTER et ses élèves emploient comme réactif précipitant l'iodure de potassium iodé. Dans ce dernier cas, on obtient une peptone iodée, mais celle-ci perd facilement son iode par lavage à l'alcool absolu.

L'amphopeptone, quel que soit d'ailleurs le mode de précipitation, ne constitue pas une espèce chimique, c'est un mélange.

HOFMEISTER et ses élèves d'une part, SIEGFRIED et ses élèves d'autre part, se sont efforcés d'en séparer les constituants.

Ecole de HOFMEISTER. — PICK (1), et après lui UMBER (1), ALEXANDER (1), ZUNZ (1), FRÄNKEL et LANGSTEIN (2) appliquent le mode opératoire suivant : au liquide acide et saturé de sulfate d'ammoniaque (PICK) ou de sulfate de zinc (ZUNZ), on ajoute, jusqu'à cessation de précipité, une solution d'iodure de potassium iodé (solution de Lugol) saturée de $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$ ou de SO^4Zn .

On recueille ce précipité, on le reprend par l'alcool à 96°. Une partie se dissout, une partie reste indissoute.

La fraction A, insoluble dans l'alcool, et la fraction B, soluble dans l'alcool, présentent plusieurs caractères communs : absence des réactions dites propeptoniques, réaction du biuret positive, etc. Leur différence de solubilité dans l'alcool, qui permet leur séparation est leur caractère distinctif le plus net. Les autres caractères différentiels varient au moins d'intensité, quelquefois même de sens, suivant la nature de la matière protéique originelle. Il n'y a pas grand fond à faire sur ces distinctions et il paraît évident que les peptones A et B sont

(1) *Loc. cit.*

(2) FRÄNKEL et LANGSTEIN. — Ueber die Spaltungsprodukte des Eiweisses bei der Verdauung. *Monatshefte für Chemie*, XXII, 335, 1900.

elles-mêmes des mélanges. FRÄNKEL et LANGSTEIN ont d'ailleurs isolé de l'amphopeptone non deux, mais quatre corps.

* *

Ecole de SIEGFRIED. — MÜHLE (1) applique au fractionnement des peptones pepsiques la méthode à l'alun de fer de SIEGFRIED (2).

Au liquide saturé de sulfate d'ammoniaque et acide par l'acide sulfurique on ajoute une solution d'alun de fer et d'ammoniaque avec précaution, jusqu'à cessation de précipité et sans excès. On obtient un premier précipité d'où, par un traitement qu'il est inutile de suivre dans le détail, on extrait une peptone A.

La liqueur filtrée est additionnée d'alun finement pulvérisé puis ramenée, par addition d'ammoniaque, à une très faible acidité. Il se fait un deuxième précipité d'où l'on extrait une peptone B.

Ces deux peptones ont été étudiées par MÜHLE, puis par BORKEL (3). On obtient avec la fibrine tantôt plus de peptone B que de peptone A (MÜHLE), tantôt plus de A que de B (BORKEL) et la peptone B serait susceptible de se transformer en peptone A.

Les deux corps se présentent sous l'aspect de poudres blanches, hygroscopiques. SIEGFRIED et ses élèves admettent que ce sont des corps chimiquement définis. Leur formule est :

Peptone A (ou α) $C^{21}H^{34}N^6O^9$

Peptone B (ou β) $C^{21}H^{32}N^6O^{10}$

Ces deux peptones sont insolubles dans l'alcool absolu, l'éther, le chloroforme, le sulfure de carbone, l'acétone, légèrement solubles dans l'alcool à 96°, solubles dans l'acide acétique et les solutions salines saturées. Leur pouvoir rotatoire gauche est :

Peptone A $[\alpha_D]_{20^\circ} = -36^\circ,36$

Peptone B $[\alpha_D]_{20^\circ} = -20^\circ,17$ à $-24^\circ,83$

Elles se comportent comme des acides, donnent des sels de baryum et de zinc de composition constante.

(1) MÜHLE. — Versuche zur Reindarstellung des Amphopeptons. *Diss. Leipzig*, 1901.

(2) SIEGFRIED. — Ueber Antipepton. *Ber. chem. Ges.*, XXXIII, 2851, 1900.

(3) BORKEL. — Ueber Pepsin-fibrin-pepton. *Z. ph. Ch.*, XXXVIII, 289, 1903.

Leurs solutions précipitent par le tanin, l'acide picrique (le précipité est soluble à chaud), le bichlorure de mercure (si les solutions sont concentrées), l'acide phosphotungstique.

Elles ne précipitent pas par le ferrocyanure acétique. Elles donnent les réactions du biuret, de Millon, d'Adamkiewicz, xanthoprotéique. La réaction de Molisch est douteuse (α) ou négative (β).

Soumise à la digestion trypsique, la peptone pepsique A fournit de l'arginine, de la tyrosine et des corps identiques aux *antipeptones* α et β de SIEGFRIED.

NEUMANN (1) pense avoir trouvé dans l'étude de leur conductibilité électrique une preuve de l'individualité chimique des deux peptones pepsiques, et donne comme vraisemblable que les « fibrine-peptones » sont des acides tribasiques faibles et des bases biacides faibles.

*
* *

Enfin dans de récents travaux effectués au laboratoire de HOFMEISTER, STOOKEY, RAPER, ROGOZINSKI s'efforcent d'extraire du mélange de peptones pepsiques quelques combinaisons définies.

STOOKEY (2) soumet à la digestion pepsique, pendant deux et huit semaines, du sérum sanguin. Le liquide privé d'albumoses est précipité successivement par le sulfate de cuivre, l'alun de fer et d'ammoniaque, l'iodure double de potassium et de mercure. Les précipités purifiés, débarrassés de sels précipitants, sont traités par divers réactifs, chlorure de benzoyle, chlorure de l'acide benzène sulfonique, etc., dans l'espoir d'isoler des corps définis.

Cet auteur isole sept fractions, mais ce ne sont certainement pas des individus chimiques ; il n'y a pas lieu d'inscrire ici leurs caractères.

RAPER (3) examine surtout la fraction précipitable par l'iodure double de potassium et de mercure : il en isole diver-

(1) NEUMANN. — Ueber Pepton. *Z. ph. Ch.*, XLV, 216, 1905.

(2) L.-B. STOOKEY. — Zur Kenntnis der Eiweisspeptone. *Hofm. Beitr.*, VII, 590, 1906.

(3) H.-S. RAPER. — Zur Kenntnis der Eiweisspeptone. *Hofm. Beitr.*, IX, 168, 1907.

ses peptones. L'une d'elles paraît être un acide bibasique ($C^{40}H^{76}N^{12}O^{13}$) ; elle donne par l'hydrolyse chlorhydrique de la lysine, de l'acide glutamique, de la proline, de la leucine et de la tyrosine.

D'autres fractions de même origine, étudiées par ROGOZINSKI (1), fournissent à l'hydrolyse, l'une surtout de l'histidine et de l'arginine plus 7 ou 8 acides monoaminés. l'autre surtout de la lysine plus quatre acides monoaminés en moindre quantité).

3° DERNIERS PRODUITS DE LA DIGESTION PEPSIQUE.

Les peptones constituent-elles les derniers termes de la digestion pepsique ?

Oui, d'après KÜHNE et NEUMEISTER. Et s'il en est vraiment ainsi, c'est là une différence fondamentale entre la pepsine et la trypsine, cette dernière dégradant d'une façon plus profonde la molécule protéique, donnant des corps relativement simples, des amino-acides cristallisables.

Pourtant HOPPE-SEYLER (2) avait admis que la digestion pepsique *prolongée* aboutit, comme la digestion pancréatique, à la production de produits cristallisables, de telle sorte qu'entre les deux processus digestifs il n'y aurait pas de différence essentielle dans le terme final, mais seulement dans la rapidité avec laquelle ce terme est atteint.

Remarquons dès maintenant que la question est sans grande importance pour le physiologiste. Physiologiquement la digestion gastrique est de durée assez courte pour que la phase des acides aminés ne puisse être atteinte, mais pour le chimiste biologiste la question conserve son intérêt, aussi l'examinerai-je de près.

Les travaux qui paraissent avoir assis avec le plus de force cette notion que les produits finaux de la digestion pepsique sont des corps définis, cristallisables, sont ceux de LAWROW, de Malfatti, de SALASKIN, de LANGSTEIN.

(1) ROGZINSKI.— Zur Kenntnis der Eiweisspeptone. *Hofm. Beitr.*, XI, 229-241, 1908.

(2) HOPPE-SEYLER.— *Physiologische Chemie*, II, 228, 1881.

En 1898, LAWROW (1) observe que dans des digestions pepsiques prolongées (de 3 à 8 semaines), il se forme des substances qui ne présentent plus la réaction du biuret ; dans une expérience qu'il prolonge pendant deux mois, il obtient une quantité importante de leucine.

Plus tard (2), en 1901, le même auteur abandonne à l'auto-digestion pendant deux mois, en présence de thymol et de chloroforme comme antiseptiques, douze kilogs d'estomac de porc divisés dans vingt litres d'acide chlorhydrique dilué à 0,5 %, et il isole du liquide digestif de la leucine, de l'acide amino-valérianique, de la tétraméthylène diamine (putrescine), de la pentaméthylène diamine (cadavérine). Il ne trouve ni tyrosine, ni bases hexoniques.

MALFATTI (3) recherche s'il se produit du tryptophane dans la digestion pepsique en notant l'apparition de la coloration rouge que ce corps donne avec l'eau bromée. Des extraits glycérinés ou des extraits dialysés de muqueuse stomacale fournissent des digestions donnant très rapidement cette réaction ; les expériences sont faites en présence d'éther et chloroforme. Mais ces extraits renferment toujours de la trypsine. Si l'on prend soin d'éliminer celle-ci par digestion prolongée en milieu fortement acide, on observe encore la réaction tryptophanique, du moins lorsque l'essai est fait en milieu chlorhydrique à 2 %. C'est donc bien à la pepsine qu'il faut rapporter la formation de tryptophane. Pourtant tous les échantillons de pepsine ne fournissent pas des digestions donnant la réaction tryptophanique. Ainsi avec la « pepsine sèche purissime » de GRÜBLER on l'obtient faiblement et quelquefois pas du tout.

SALASKIN (4), en soumettant pendant huit à trente jours de l'oxyhémoglobine de cheval à l'action de six à vingt fois son poids de suc gastrique de chien isole des produits de la digestion de la leucinimide cristallisée.

(1) LAWROW. — Zur Kenntnis des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe. *Z. ph. Ch.*, XXVI, 513, 1898.

(2) LAWROW. — Même titre. *Z. ph. Ch.*, XXXIII, 312, 1901.

(3) H. MALFATTI. — Beitrag zur Kenntnis der peptischen Verdauung. *Z. ph. Ch.*, XXXI, 43, 1900.

(4) SALASKIN. — Ueber die Bildung von Leucinimid bei der peptischen und tryptischen Verdauung des Oxyhämoglobins resp. des Globins. *Z. ph. Ch.*, XXXII, 592, 1901.

En collaboration avec K. KOWALEWSKY (1), il trouve, dans des conditions analogues (durée de la digestion 57 jours; chloroforme et éther comme antiseptiques), la leucinimide déjà signalée et en outre une série de corps qu'il isole par la méthode d'E. FISCHER: alanine, leucine, tyrosine, acide glutamique, acide aspartique, phénylalanine, acide pyrrolidine carbonique.

LANGSTEIN (2) fait digérer de la sérum-albumine et de l'ovalbumine par de la pepsine de GRÜBLER (à 2 %) en milieu sulfurique à 1 %. Il abandonne la digestion à elle-même pendant une année (!) et il retire des liquides digestifs les corps suivants: leucine, tyrosine, phénylalanine, acide glutamique, acide aspartique, cystine, lysine, pentaméthylène diamine, oxyphényléthylamine, plus un hydrate de carbone azoté et divers corps trop peu abondants pour qu'il ait pu les caractériser avec certitude.

Malgré cet ensemble concordant d'observations, il me semble qu'il n'en faut accepter les conclusions qu'avec réserves.

Malgré l'introduction d'agents antiseptiques, thymol, chloroforme, éther, est-on bien assuré que les microbes ne soient jamais intervenus? En éliminant même cette hypothèse, est-on bien certain que l'action observée doive être rapportée uniquement à la pepsine? Celle-ci n'était pas toujours pure; dans les expériences d'auto-digestion gastrique, elle n'est certainement pas le seul ferment qui entre en jeu.

Et puis dans des expériences qui se prolongent parfois plusieurs mois, n'y a-t-il pas lieu de faire une place à l'action propre de l'acide?

On sait en effet que les acides seuls, même étendus et à froid, peuvent hydrolyser les matières protéiques; c'est une simple question de temps (Expériences de SWIRLOWSKY) (3). Je

(1) SALASKIN et KATHARINA KOWALEWSKY. — Ueber die Wirkung des reinen Hundemagensaftes auf das Hemoglobin, resp. Globin. *Z. ph. Ch.*, XXXVIII, 567, 1903.

(2) LANGSTEIN. — Zur Kenntnis der Endprodukte der peptischen Verdauung. *Hofm. Beitr.*, I, 507, 1901. — Die Endprodukte des Kristallisierten Ovalbumins. *Hofm. Beitr.*, II, 229, 1902.

(3) SWIRLOWSKY. — Zur Frage nach der Einwirkung von verdünnter Salzsäure auf die Eiweissstoffe. *Z. ph. Ch.*, XLVIII, 252, 1906.

erois que la question reste ouverte, d'autant plus que d'autres auteurs ont recherché les acides aminés dans des liquides de digestion pepsique et ne les ont point trouvés on n'en ont trouvé que des traces.

E. ABDERHALDEN et O. ROSTOCKI (1) ont soumis à la digestion pepsique (par du suc gastrique recueilli suivant la méthode du petit estomac de PAWLOW) 500 gr. d'édestine de semences de cotonnier. Ils ont soumis à la dialyse des portions, prélevées à intervalles éloignés (17, 32, 48, 56 jours), du liquide de digestion. Ils n'ont trouvé dans le dialysat que des traces de tyrosine. La partie dialysée n'en contenait pas, ni aucun autre acide aminé.

HANS FISCHER (2) n'a pas trouvé d'acides aminés après vingt jours de digestion de la fibrine par du suc gastrique naturel.

Plusieurs des travaux cités dans le paragraphe relatif aux peptones pepsiques plaident dans le même sens.

Au reste, entre l'opinion de KÜHNE : « la digestion pepsique donne comme terme final des peptones, corps biurétiques », et l'opinion toute opposée d'HOPPE-SEYLER : « la digestion pepsique donne comme terme final des corps cristallisables abiurétiques », peut-être y a-t-il place pour une opinion intermédiaire : le terme final de la digestion pepsique serait représenté par des corps abiurétiques qui ne seraient pas des amino-acides, mais seraient intermédiaires entre les peptones et les acides aminés.

Des observations de ZUNZ et de PFAUNDLER se rapportent à cette manière de voir.

ZUNZ (3) observe qu'il se forme dans la digestion pepsique une proportion notable de corps ne donnant plus la réaction du biuret, — et cela dès le début de cette digestion.

PFAUNDLER (4) recherche quels sont ces corps. Ses essais

(1) E. ABDERHALDEN et O. ROSTOCKI. — Die Monoaminosäuren des Edestins aus Baumwollsamensamen und dessen Verhalten gegen Magensaft. *Z. ph. Ch.*, XLIV, 265, 1905.

(2) HANS FISCHER. — Zur Kenntniss der Pepsinverdauung. *Dtsch. Arch. f. Klin. Med.*, XCIII, Juin 1908, d'ap. *Bioch. Ctb.*, VII, 713, 1908.

(3) ZUNZ. — Ueber den quantitativen Verlauf der peptischen Eiweiss-spaltung. *Z. ph. Ch.*, XXVIII, 132, 1899.

(4) PFAUNDLER-MEINHARDT. — Zur Kenntniss der Endprodukte der Pepsinverdauung. *Z. ph. Ch.*, XXX, 90, 1900.

portent sur la sérum-albumine et sur la fibrine. Il les soumet à des digestions prolongées six mois avec de la pepsine de Grubler 3 %₀₀, en milieu acide 1 %₀ à la température de 35-40°. Il sépare les albumoses par SO_4Zn puis les peptones par I ou l'acide phosphotungstique. Des liqueurs filtrées ne fournissant plus la réaction du biuret, il tente vainement d'extraire de la leucine ou de la tyrosine, de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique. Mais ces liquides contiennent des corps susceptibles de donner par hydrolyse acide des acides aminés.

PFAUNDLER conclut que ces corps abiurétiques, non précipitables par l'acide phosphotungstique, intermédiaires entre les peptones et les amino-acides, sont les vrais termes finaux de la digestion pepsique.

Il ne me semble pas que les faits publiés depuis lors aient atténué la portée de ces conclusions.

..

4° VALEUR DE LA DIVISION DES PRODUITS DE DIGESTION PEPSIQUE EN NOMBREUSES ALBUMOSES ET PEPTONES. LES PEPTIDES D'E. FISCHER.

Ainsi les travaux faits dans ces dix ou douze dernières années ont singulièrement transformé le schéma de la digestion pepsique que l'école de KÜNNE avait rendu classique. Elles ont ruiné l'hypothèse de l'hémi et de l'anti-groupe, telle du moins que la concevait KÜNNE; elles ont multiplié les termes de dégradation de la molécule protéique, subdivisé albumoses et peptones en fractions nombreuses.

Est-ce à dire que tous ces travaux aient donné des résultats proportionnés aux efforts qu'ils ont coûtés? On peut hardiment répondre non.

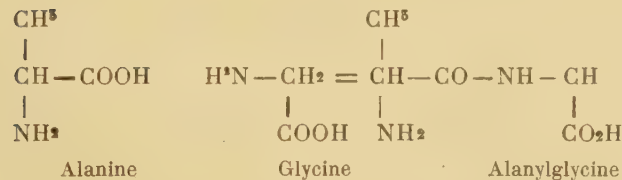
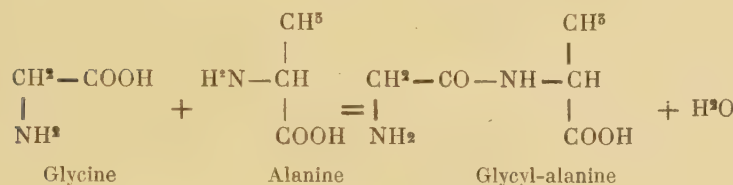
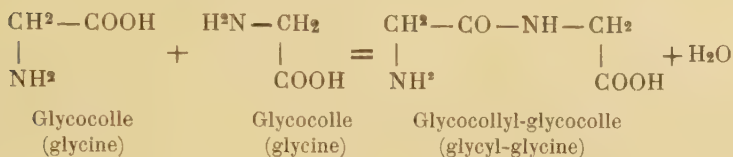
Si, les réunissant dans une vue d'ensemble, on cherche à résumer l'impression qui s'en dégage, on vient à penser que tous les groupements créés ont quelque chose d'artificiel, que la division fondamentale en albumoses et peptones elle-même est bien fragile.

Or c'est la conclusion même qu'impose la belle série de

recherches qu'Emil FISCHER (1) et ses collaborateurs poursuivent actuellement sur les *polypeptides*.

On sait ce qu'il faut entendre sous ce nom.

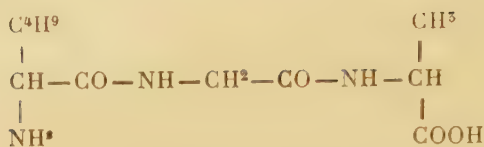
Deux acides aminés sont susceptibles, dans des conditions expérimentales dont l'exposé n'entre pas dans le plan de ce mémoire, de s'unir l'un à l'autre avec perte de H²O, comme l'indiquent les formules suivantes :



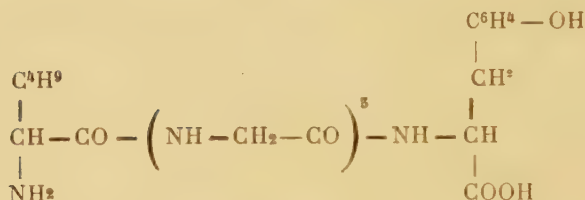
On voit que l'élimination de l'eau se fait aux dépens du groupement aminogène de l'un des amino-acides et du carboxyle de l'autre créant ainsi une fonction amide. Or on peut ainsi associer dans des chaînes de complication croissante 3, 4, 5... 10... acides aminés ; on obtient ainsi des tri, tétra, penta, déca-peptides.

(1) Les travaux publiés par Emil FISCHER et ses collaborateurs sur ce sujet sont réunis dans l'ouvrage suivant : E. FISCHER. Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine, *Julius Springer*, Berlin, 1906. Voir aussi: E. ABDERHALDEN. Neuere Ergebnisse auf dem Gebiete der speziellen Eiweisschemie, *Gustav. Fischer*, Iéna, 1909.

Exemples :



Leucyl-Glycyl-Alanine



Leucyl-Triglycyl-Tyrosine

Ajoutons que ces peptides peuvent être préparés avec les amino-acides actifs droits ou gauches, tels, par exemple, qu'on les obtient dans l'hydrolyse trypsique des substances protéiques (1).

On obtient dans ces conditions des corps très compliqués, tel, par exemple, l'*octo-decapeptide*, récemment préparé par E. FISCHER, à poids moléculaire élevé 1213 pour ce polypeptide, et dont les propriétés rappellent étonnamment les propriétés des albumoses. Cette similitude est particulièrement remarquable pour ceux de ces peptides qui renferment la molécule de la tyrosine, tel par exemple la l-leucyl-triglycyl-l-tyrosine.

Ce peptide est soluble dans l'eau, précipitable par l'alcool. La solution aqueuse est acide au tournesol; elle donne fortement la réaction du biuret et celle de MULLOX. Ce pentapeptide est précipité par une solution saturée de sulfate d'ammoniaque, par le chlorure de sodium acétique, par le tannin et l'acide phosphotungstique.

La conclusion à tirer de ces faits, c'est que les différentes fractions d'albumoses et de peptones envisagées ne dérivent nullement les unes des autres, que la précipitation ou la non-

(1) On les obtient d'ailleurs synthétiquement par les méthodes développées par E. FISCHER.

précipitation par les sels sont en relation avec la nature des acides-aminés qui entrent dans la structure de leurs molécules et non avec leur nombre ou leur complication.

Un produit relativement simple de décomposition sera compté comme albumose, parce qu'il précipite par le sulfate d'ammoniaque, précipitation qui est liée à la présence de tel groupement dans sa molécule, le groupement tyrosine, par exemple. Un produit beaucoup plus complexe sera, au contraire, compté comme peptone, parce qu'il ne précipite pas par le même réactif, et le fait est lié simplement à l'absence de tel ou tel acide-aminé.

Dans ces conditions, on ne saisit plus le sens exact des mots albumose et peptone ; la barrière qui les sépare est très artificielle.

Le terme « *peptones* » pourrait s'appliquer à l'ensemble des produits qui résultent de la digestion pepsique et, si le mot « *albumose* » est conservé, il ne doit pas évoquer d'autre idée que celle de « *peptone précipitable par le sulfate d'ammoniaque* ».

Action de la pepsine sur des substances protéiques autres que des protéines.

Lorsqu'on soumet à l'action du suc gastrique ou des extraits de muqueuse des substances protéiques autres que des protéines, elles subissent, entièrement ou partiellement, une décomposition dont la rapidité et l'intensité varient avec la substance envisagée. Dans quelle mesure ces actions sont-elles le fait du ferment « pepsine » ? C'est ce que, pour l'instant, il est assez difficile de dire. Nous les passerons rapidement en revue dans ce paragraphe.



La pepsine n'attaque pas les *protamines*. Elle digère les *histones* avec formation d'histopeptones. KOSSEL (1) a étudié la peptone pepsique de l'histone du thymus de veau et l'a subdivi-

(1) S. KOSSEL et H. PRINGLE.— Über Protamine und Histone, IV, Über das Histon, *Z. ph. Ch.*, XLIX, 314, 1906.

visée en fractions, A, B, C, dont il a donné la teneur en bases hexoniques.

*
* *

Les *caséines* constituent les matières protéiques les plus importantes des laits de mammifères : elles représentent les types les mieux connus des substances improprement désignées sous le nom de paranucléoprotéides ou nucléalbumines.

Le premier acte de la digestion gastrique des caséines est la « caséification » ; on rapporte ce phénomène — nous verrons plus tard en quoi il consiste — à une diastase particulière, la présure.

D'après quelques auteurs, présure et pepsine constituent un même ferment, mais nous nous en tiendrons pour l'instant à la notion courante.

Physiologiquement, la digestion gastrique de la caséine est sans grand intérêt : elle ne séjourne qu'un temps assez court dans l'estomac ; de récentes expériences de M. L. GAUCHER (1) montrent qu'elle n'y est jamais peptonisée. Mais nous ne nous arrêtons pas au point de vue du physiologiste.

Lorsqu'on la soumet à une digestion pepsique prolongée, elle est transformée en un mélange d'albumoses et de peptones. Les caséine-protéoses, ou caséoses, ont été étudiées par THIERFELDER (2), CHITTENDEN (3), SEBELIEN (4). — ALEXANDER (5) a appliqué à leur séparation la méthode de PICK (précipitation fractionnée par le sulfate d'ammoniaque), ZUNZ (6) sa méthode au sulfate de zinc. Ces fractions correspondent à celles que

(1) L. GAUCHER. — Sur la digestion gastrique de la caséine. C. R., CXLVIII, 56, 1909.

(2) THIERFELDER. — Zur Kenntniss der Kaseinpeptone, *Z. ph. Ch.*, X, 577, 1886.

(3) R. CHITTENDEN et H. M. PAINTER. — Casein and its primary cleavage products. *Studies from the laboratory of physiological chemistry, Yale University*, II, 156, 1887, et Caseoses, Casein-Dyspeptone and Casein-peptone, *idem.*, III, 66, 1890.

(4) SEBELIEN. — Sur les peptones et des substances analogues. *Tidskrift for Physik og Chemi*, IX, 234, 1890, d'ap. *Chem. Gtb.*, I, 171, 1890.

(5) ALEXANDER. — Zur Kenntniss des Caseins und seiner Spaltungsprodukte, *Z. ph. Ch.*, XXV, 410, 1898.

(6) ZUNZ. — *Loc. cit.*

nous avons étudiées pour les protéines. Il se produit dans cette digestion des corps abiurétiques.

E. FISCHER et E. ABDELHALDEN (1) en ont isolé de la tyrosine, une petite quantité d'acide α -pyrrolidine-carbonique, et un polypeptide donnant la réaction du biuret, et résistant à la digestion trypsique; nous le retrouverons.

La digestion pepsique de caséine laisse un résidu (2) constitué par une substance plus riche en phosphore que la caséine et désignée sous le nom de paranucléine (KOSSEL) ou pseudo-nucléine (HAMMARSTEN). Les paranucléines n'ont, d'ailleurs, rien de commun avec les nucléines vraies. Elles ne fournissent pas d'acides nucléiques exempts de toute matière protéique et dédoublables par les acides et les alcalis avec production de bases pures; elles donnent des acides dits « paranucléiques » et possédant les réactions des matières protéiques.

Le résidu de paranucléine est plus ou moins abondant suivant l'origine de la caséine: la caséine de chèvre en laisse beaucoup plus que la caséine de vache (LONG) (3).

VON MORACZEWSKI (4) a étudié comment se distribuent le phosphore et le soufre dans les différents produits de digestion de la caséine. ALEXANDER (5) a montré que la digestion pepsique de la caséine, si elle est suffisamment prolongée, se fait sans résidu de paranucléine, et que toutes les fractions d'albumoses primaires, secondaires, et de peptones renferment plus ou moins de phosphore.

D'après SALKOWSKI (6), le phosphore entrerait en dissolution

(1) E. FISCHER et E. ABDELHALDEN. — *Über die Verdauung des Caseins durch Pepsinsalzsäure und Pankreas-fermente*, *Z. ph. Ch.*, XL, 215, 1903.

(2) La digestion de presque toute matière protéique laisse un résidu généralement très petit. C'est ce résidu que MEISSNER appelait *dyspeptone*.

(3) J. H. LONG. — *Am. chem. Soc.*, XXIX, 223, 1907.

(4) VON MORACZEWSKI. — *Verdaunungsprodukte des Caseins und ihr Phosphorgehalt*, *Z. ph. Ch.*, XX, 28, 1894 et *Ueber den Schwefelgehalt der Verdaunungsprodukte des Caseins*, *Hofm. Beitr.*, V, 489, 1905.

(5) ALEXANDER. — *Loc. cit.*

(6) SALKOWSKI. — *Ueber das Verhalten des Caseins zur Pepsinsalzsäure*, *Pflüg. Arch.* LXIII, 405 et *über eine phosphorhaltige Säure aus Casein und deren Eisenverbindung*, *Z. ph. Ch.* XXXII, 245, 1901.

non nous forme d'acide phosphorique, mais sous forme d'acide paranucléique. Il a isolé cet acide sous forme de combinaison ferrique renfermant 22 % de fer, 25 % de phosphore, 9 % d'azote. Cet acide est soluble dans l'eau; il donne la réaction du biuret.

Les *vitellines* fournissent, par digestion pepsique, des *vitelloses* (NEUMEISTER) avec un résidu analogue aux paranucléines.

L'*ovovitelline*, retirée de l'œuf de poule, laisse, sous l'action de la pepsine chlorhydrique, de l'*hématogène*, paranucléine ferrugineuse étudiée par BUNGE (1) et par HUGOUNENQ (2).

*
* *

Dans les *nucléoprotéides*, la partie protéinique de la molécule est hydrolysée par la pepsine dans les conditions habituelles, la nucléine reste inattaquée. UMBER a étudié la décomposition pepsique d'un nucléoprotéide extrait du pancréas.

Avec les *métalloprotéides*, dont l'*oxyhémoglobine* est le type, l'action pepsique est du même ordre. Le pigment sanguin fournit, d'une part: la globine, substance protéique du groupe des histones, qui est digérée; d'autre part, l'hématine, groupement prosthétique ferrugineux, qui reste inaltérée. Cette méthode de séparation de l'hématine est très pratique et constitue un procédé de préparation de cette substance (R. ZEYNEK) (3).

*
* *

La pepsine transforme la *gélatine* en *gélatoses* (ou glutoses) et en *gélatine-peptone* (ou glutine-peptone).

On peut, par la méthode des sels neutres, scinder les *gélatoses* en proto et deutéro-*gélatoses*. Il est intéressant d'observer que ces *gélatoses* pepsiques vont en s'enrichissant en glyco-colle.

(1) BUNGE. — Ueber die Assimilation des Eisens. *Z. ph. Ch.*, IX, 49, 1884.

(2) HUGOUNENQ et A. MOREL. — Recherches sur l'hématogène et l'origine de l'hémoglobine. *J. de Phys. et de Path. gén.*, VIII, 391, 1906.

(3) R. ZEYNEK. — Ueber das durch Pepsinsalzsäure aus Oxyhämoglobin entstehende Hematin und Hemochromogene. *Z. ph. Ch.*, XXX, 126, 1900.

LEVENE (1) donne, à ce propos, les chiffres suivants :

Glycocolle p. % de gélatine.....	16,43
— — de protogélatose...	18,36
— — de deutéroélatose..	19,96

Des produits de digestion pepsique de la gélatine on extrait par la méthode de SIEGFRIED une peptone que SCHERMESSE (2) a particulièrement étudiée. Cette glutine-peptone pepsique donne avec intensité la réaction du biuret ; elle ne donne pas la réaction xanthoprotéique. Elle est lévogyre $[\alpha_D] = - 77^\circ 4$.

L'auteur lui attribue la formule $C^{23}H^{39}N^7O^{10}$.

Son sel de zinc renferme 4,97 % de Zn, son sel de Ba, 10,14 de Ba. Par hydrolyse sulfurique, elle fournit de l'arginine, de la lysine, de l'acide glutamique et du glycocolle.

NEUMANN (3), en appliquant la méthode électrométrique, confirme l'individualité chimique de cette substance et son caractère d'acide tribasique faible et de base biacide faible.

*
* *

Les *mucines* et *mucoides* sont inattaqués ou le sont difficilement par la pepsine.

La substance fondamentale du cartilage, *substance collagène* associée à l'acide *chondroïtine-sulfurique*, est lentement attaquée par la pepsine. Le résidu est la « peptochondrine », d'où l'on extrait l'acide chondroïtine-sulfurique (SCHMIEDEBERG).

Les mucoides du tissu conjonctif sont également attaqués lentement avec formation de mucoprotéoses et abandon d'un résidu renfermant le groupement d'un sucre azoté (POSNER et GIES) (4).

L'*élastine* est aisément dissoute par la pepsine ; il se fait de

(1) LEVENE.— Ueber die Spaltung der Gelatine. *Z. ph. Ch.*, XXXVII, 81, 1902.

(2) SCHERMESSE.— Zur Kenntnis der peptischen Verdauung des Leims. *Z. ph. Ch.*, XXXVII, 363, 1903, et Ueber Pepsin-Glutin-Pepton. *Z. ph. Ch.*, XLI, 68, 1904.

(3) NEUMANN.— Ueber Peptone. *Z. ph. Ch.*, XLV, 216, 1905.

(4) POSNER et GIES.— A preliminary study of the digestibility of connective tissue mucoids in pepsin-hydrochloric acid. *Amer. J. of Physiology*, XI, 330, 1904.

l'hémi-élastine et de l'élastine-peptone. Ces substances ont été étudiées par HORBACZEWSKI (1).

Les *kératines* sont inattaquables par la pepsine. On obtient la kératine de la corne en soumettant la matière cornée épuisée à l'eau, l'alcool, l'éther et les acides étendus, à l'action successive de la pepsine et d'un suc pancréatique artificiel.

La pepsine agit sur les *toxines*, la tuberculine par exemple, dont elle détruit la toxicité (KINGHORN) (2).

On peut enfin se demander quelle action elle est susceptible d'exercer sur d'autres diastases et sur elle-même.

Elle détruit l'amylase et la trypsine, M. BOURQUELOT (3) a proposé d'utiliser cette propriété pour distinguer la pepsine de la trypsine.

De même, d'après HARLAY (4), lorsqu'on met en présence, dans les conditions normales d'acidité nécessaires à la digestion pepsique, de la pepsine et de la trypsine ou de la papaïne, on constate que ces dernières sont détruites, mais l'acide à lui seul opère déjà cette destruction.

HERLITZKA (5) abandonne de la pepsine à l'étuve ; il constate qu'il se fait des peptones ; en même temps la diastase perd de son activité ; il y a autodigestion du ferment ; cette observation fortifierait d'après lui l'opinion que la pepsine est elle-même une substance protéique.

*
*
*

Enfin pour clore cette série de faits, il faut rappeler que la pepsine s'est montrée impuissante à dédoubler quelques peptides que la trypsine dédouble (Glycyl-tyrosine, dialanyl-cystine). C'est entre ces deux diastases un caractère différentiel important. La pepsine ne dédoublera plus la leucyl-ala-

(1) HORBACZEWSKI.— Ueber die durch Einwirkung von Salzsäure aus den Albuminoiden entstehenden Zersetzungsprodukte. *Monatshefte f. Ch.* 6, 639, 1885.

(2) KINGHORN.— Action of pepsin digestion on tuberculin. *J. of Med. Res.*, XII, 213, 1904, d'ap. *Bioch. Ctb.*, III, 153, 1904.

(3) EM. BOURQUELOT.— Sur les caractères pouvant servir à distinguer la pepsine de la trypsine. *J. Ph. Ch.*, [5] X, 177, 1884.

(4) V. HARLAY. — Thèse citée.

(5) HERLITZKA.— Sull. autodigestione della pepsina. *Att. d. R. Akad. dei Lincei*, XIII, 1904, d'ap. *Bioch. Ctb.*, III, 304, 1904.

nine, la leucyl-glycine, la leucyl-leucine (E. FISCHER ET E. ABDERHALDEN). (1).

C. — Mesure de l'activité pepsique.

La mesure de l'activité pepsique, s'impose dans des circonstances très diverses, soit qu'il s'agisse pour le physiologiste d'apprécier l'activité d'un suc organique, pour le chimiste de doser en quelque sorte la pepsine d'un suc gastrique normal ou pathologique, pour le pharmacien de vérifier le titre d'une pepsine médicinale.

A ces besoins différents, correspondent des méthodes différentes ; les unes purement cliniques et qui visent plus à la rapidité qu'à la précision, les autres d'allure plus scientifique et susceptibles de conduire à l'énoncé de la *loi d'action* de la pepsine.

Quant aux méthodes pharmaceutiques, (elles ne constituent pas à proprement parler des méthodes de mesure.

Il ne s'agit point pour le pharmacien de déterminer le titre exact, le titre limite d'une pepsine, mais de constater si une pepsine répond ou non aux conditions de titre imposées par la Pharmacopée.

Les méthodes pharmaceutiques trouveront naturellement leur place à l'essai des pepsines médicinales (voir page 81). Ici j'envisagerai la question dans son ensemble, essayant de grouper les méthodes dans un ordre logique et insistant sur celles dont le caractère est plus particulièrement scientifique.

Il serait extrêmement important que chimistes et physiologistes fussent d'accord pour employer une même méthode de mesure, afin de rendre comparables les résultats obtenus. Ceux-ci ne sauraient l'être si l'on emploie des substances protéiques différentes et si l'on apprécie l'activité pepsique par la mesure d'effets distincts.

Les diverses techniques utilisent en effet la fibrine fraîche

(1) E. FISCHER ET E. ALDERHALDEN.— Ueber das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft. *Z. ph. Ch.*, XLVI, 52, 1905.

ou sèche, l'ovalbumine coagulée ou non, la sérum-albumine, l'édésine du chanvre, la ricine, la caséine, la gélatine.

Il ne saurait être indifférent d'employer : ou une albumine ou une globuline, ou telle substance plus éloignée de celles-ci.

Il est tout à fait conforme à l'idée dominante de ce travail de proposer le rejet de toute substance autre qu'une protéine et de fixer le choix sur la fibrine, la sérumalbumine ou l'albumine d'œuf.

D'autre part, lorsqu'une protéine est digérée par la pepsine, elle subit une série de transformations dont l'étude a fait l'objet des pages précédentes, et qui se traduisent par la solubilisation de la matière protéique, sa transformation en substances incoagulables, des changements dans le pouvoir rotatoire et la viscosité de la solution, etc.

Bien que tous ces effets relèvent d'une même cause, celle que l'on veut mesurer, il n'est pas démontré qu'il soit sans importance d'apprécier indifféremment tel ou tel d'entre eux.

Ces généralités ont pour but de montrer qu'il est urgent d'unifier les méthodes et de mettre entre les mains des expérimentateurs, une méthode commune, suffisamment précise et commode.

Celle qui jusqu'ici a reçu l'accueil le plus bienveillant de la part des expérimentateurs, est la méthode de MERT. Sa commodité la recommande, mais il ne semble pas que, même avec les perfectionnements qu'on lui a apportés elle puisse répondre à tous les desiderata. Nous étudierons plus loin, à propos de la trypsine, une méthode due à SÖRENSEN, qui, appliquée à l'étude de la digestion pepsique, paraît, au moins théoriquement, devoir fournir des résultats supérieurs à toute autre.

*
* *

a) *Méthodes basées sur une propriété physique des liquides de digestion.*

Dans un premier paragraphe je groupe les méthodes basées sur quelque propriété physique des liquides de digestion pepsique.

A ce groupe appartiendraient les anciennes méthodes de SCHIFF (1) et de GRÜNHAGEN (2) si peu exactes et si bien tombées en désuétude qu'elles ne méritent guère qu'une simple mention.

Plus précises sont les méthodes de E. SCHÜTZ (3) et de SPRIGGS (4).

SCHÜTZ apprécie l'intensité digestive d'après la grandeur du *pouvoir rotatoire* gauche des liquides de digestion.

SPRIGGS suit au moyen du viscosimètre d'OSWALD, les variations de *viscosité* des solutions de diverses matières protéiques digérées par la pepsine. A un coefficient déterminé de viscosité correspond une proportion toujours constante de substances coagulables et non coagulables et ce coefficient est plus ou moins rapidement atteint suivant la quantité de pepsine.

Les solutions d'albumine ont la *propriété de mousser* par agitation. Si l'on agite une solution d'albumine additionnée de pepsine chlorhydrique, il se fait une couche de mousse; celle-ci, quand on maintient l'essai au thermostat, disparaît progressivement et d'autant plus vite que la teneur du mélange en pepsine est plus grande. Tel est le principe de la méthode de BETTMANN et SCHROEDER (5).



b) *Méthodes basées sur la mesure de la quantité de substance protéique digérée en un temps donné.*

D'une importance pratique plus considérable sont les méthodes que je réunis dans ce second groupe.

La première à citer est la méthode classique de METT.

Le procédé de METT (6) consiste à « aspirer dans un tube en verre de 1 à 2 millimètres de diamètre, de l'albumine d'œuf liquide que l'on y fait coaguler à une température de 95°; ces tubes sont ensuite découpés en

(1) SCHIFF. — Leçons de physiologie de la digestion. Paris, 1867, I, 402.

(2) GRÜNHAGEN. — Neue Methode die Wirkung des Magen-pepsins zu veranschaulichen und zu messen. *Pflüg. Arch.*, V, 203, 1873.

(3) E. SCHÜTZ. — Methode zur Bestimmung der relativen Pepsinmengen. *Z. ph. Ch.*, IX, 577, 1887.

(4) SPRIGGS. — Eine neue Methode zur Bestimmung der Pepsinwirkung. *Z. ph. Ch.*, XXXV, 465, 1902.

(5) BETTMANN et SCHROEDER. — Ueber die Bestimmung der proteolytischen Kraft des Magensaftes nebst Beschreibung einer Modification der Hammerschlagschen Methode und einer neuen Methode. *Boas. Arch.*, X, 599, 1905.

(6) S.-G. METT. — Contribution à la physiologie des sécrétions. *Diss. en Russe*, 1889 et *Arch. f. Anat. u. Physio. Phys. Abt.*, 58, 1894. — La méthode est citée d'ap. PAWLOFF. Le travail des glandes digestives. Trad. franç. par PACHON et SABRAZÈS. Paris, 1901, p. 38.

petits morceaux que l'on plonge dans 1 ou 2 c³ du liquide en expérience.

Le tout est placé à l'étuve à 37-38° pendant 10 heures, sans autre précaution particulière. La liquéfaction de l'albumine se produit alors aux extrémités des petits tubes. Au bout du temps indiqué, on mesure au microscope et à un faible grossissement à l'aide d'une réglette divisée en millimètres et en fractions de millimètres, la longueur totale du segment du tube employé et la longueur du cylindre d'albumine non digéré. La différence exprime en millimètres et en fractions de millimètres la longueur d'albumine digérée ; soit l'intensité de la digestion.

Ce procédé, dit PAWLOFF, à qui nous empruntons ces lignes, ne laisse rien à désirer aux divers points de vue de la commodité de son emploi, de la netteté et de la précision des résultats.

Des expériences particulières (Dr SSAMAJLOFF) nous ont montré que la quantité digérée du cylindre d'albumine, du moins pendant les 10 premières heures, et dans les essais poursuivis sur des liquides comme les nôtres est proportionnelle au temps de digestion ; c'est même le cas lorsque les liquides présentent le maximum de pouvoir digestil. Ceci exclut tout soupçon possible que la liquéfaction de l'albumine, à différentes profondeurs se produise avec une vitesse variable, tenant à la plus ou moins grande obstruction de la lumière du tube, par les produits de la digestion.

La valeur exprimée en millimètres, d'albumine digérée dans le même temps par divers sucs, donne donc la mesure précise du pouvoir digestif respectif de ces sucs. »

Bien que chaleureusement recommandée par PAWLOFF, la méthode de METT a été vivement critiquée ; elle n'est pas exacte a-t-on dit, avec les solutions concentrées de ferment, avec le suc gastrique pur : elle donne des résultats discordants suivant l'état physique de la substance protéique qui remplit les tubes, suivant la nature de celle-ci, etc. (Voir : NIERENSTEIN et SCHIFF (1), KAUFMANN (2). SAWJALOW (3), KOETTLITZ (4). Le reproche le plus grave qu'on puisse lui adresser, tient évidemment à ce que la solution diastasique n'atteint l'albumine

(1) NIERENSTEIN et SCHIFF. — Ueber die Pepsinbestimmung nach Mett. *Arch. f. Verd. Kr.*, VIII, 559, 1902, d'ap. *Bioch. Ctb.*, I, 232, 1903.

(2) KAUFMANN. — Zur Frage der quantitativen Pepsinbestimmung nach Mett. *Arch. f. Verd. Kr.*, IX, 562, 1903, d'ap. *Bioch. Ctb.*, II, 325, 1904.

(3) W. SAWJALOW. — Zur Frage nach der Identität von Pepsin und Chymosin. *Z. ph. Ch.*, XLVI, 307, 1905.

(4) KOETTLITZ. — Note sur le dosage de la pepsine. *Bull. Soc. Roy. d. Sc. Méd. et Nat. de Bruxelles*, p. 229, 1905.

à digérer que par diffusion et que les surfaces de contact ne se renouvellent pas assez rapidement (DUCLAUX).

Parmi les modifications qu'on a apportées à la méthode de METT, signalons comme les plus intéressantes, celle de NIERENSTEIN et SCHIFF (dilution des sucres de façon à en égaliser l'acidité), de JASTROWITZ (1) (agitation mécanique des tubes), de H. MEIER (2), (préparation des tubes sans bulles d'air, mesure plus précise de l'albumine non dissoute), et surtout celle de M. MALFITANO (3).

Cet autepyr remplit de gélatine, d'albumine d'œuf ou mieux de sérum-albumine des tubes de METT, gradués en millimètres, sur le quart de leur longueur à partir de l'une des extrémités. D'autre part, chacun des tubes plonge dans une éprouvette étroite et le système est stérilisé.

Le dispositif de MALFITANO permet d'opérer à l'abri des microbes et de lire à tout moment sur la graduation, la quantité de substance protéique attaquée par la diastase.

Les méthodes de GRÜTZNER (4), de KLUG (5), de ROAT (6), sont des méthodes colorimétriques.

Dans la méthode de GRÜTZNER, on colore au carmin la fibrine que l'on soumet à la digestion pepsique. En un temps donné il se dissout d'autant plus de fibrine et par suite d'autant plus de matières colorantes que la pepsine est plus active et l'on apprécie cette activité par une mesure colorimétrique.

O'SULLIVAN (7) mesure l'activité protéolytique de la pepsine en dosant l'azote total dissous dans le liquide de digestion.

(1) JASTROWITZ. — Hemmung der peptischen Verdauung. *Bioch. Zeitschr.*, II, 157, 1907.

(2) H. MEIER. — Ueber eine Verbesserung des Mett'schen Verfahrens zur Bestimmung der verdauenden Kraft von Flüssigkeiten *Berl. Klin. Woch.*, 4012, 1906, d'ap. *Bioch. Ctb.*, V, 225, 1906,

(3) MALFITANO. — Tubes de Mett d'albumine et de gélatine gradués et stériles. *C. R. Biologie*, LVI, 33, 1904.

(4) GRÜTZNER. — Ueber eine neue Methode Pepsinmengen colorimetrisch zu bestimmen, *Pflüg. Arch.*, VIII, 452.

(5) KLUG. — Untersuchungen über Pepsinverdauung. *Pflüg. Arch.*, LX, 43, 1895.

(6) ROAT H.-E. — A new colorimetric method to show the activity of either peptic or tryptic enzymes. *Bioch. Journ.*, III, 188, 1908.

(7) O'SULLIVAN. — A method of determining the proteolytic action of pepsin. *J. Soc. Chem. Ind.*, XXIV, 830, 1905.

THOMAS et WEBER (1) font digérer une solution chlorhydrique de caséine (5 grammes caséine dissous à chaud dans 250c³ d'acide chlorhydrique à 0,1 %) par la pepsine dont on veut mesurer l'activité. Au bout d'une heure on précipite par le sulfate de soude la caséine non digérée, on recueille le précipité, on le sèche, on le pèse. Par différence, on a la caséine dissoute et ces quantités servent de mesure à l'activité protéolytique.

Les méthodes d'HAMMERSCHLAG (2), de BETTMANN et SCHROEDER (3), purement cliniques dosent grossièrement l'albumine non digérée en un temps donné, en la précipitant par l'acide picrique ou l'acide trichloracétique et en mesurant le volume après centrifugation dans un tube gradué.

ILLOWAY (4) mesure l'activité pepsique d'après le temps que mettent à se dissoudre des cubes égaux d'ovalbumine coagulée.

* *

c) *Méthodes basées sur la détermination de la quantité de ferment produisant, en un temps donné, un effet déterminé.*

Peuvent être rapprochées dans une troisième série, d'après le principe qui les inspire, les méthodes de JACOBY (5). FULD et LEVISON (5), d'OSKAR GROSS (7).

JACOBY utilise comme substance protéique la ricine. On fait une solution de ce corps dans le chlorure de sodium qu'on répartit également dans des vases appropriés, on fait des dilutions variées de la pepsine à doser. La quantité minima de pepsine qui en trois heures éclaircit la solution opalescente de ricine représente l'unité.

(1) P. THOMAS et W. WEBER. — Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung der tryptischen und peptischen Enzymwirkung. *Ctb. f. Stoffwechs. u. Verdauungs Krank.*, n° 14, 1901, d'ap. *J. Ph. Ch.*, XIV, 528, 1901.

(2) HAMMERSCHLAG. — *Intern. Klin. Rundsch.*, cité d'après les suivants.

(3) BETTMANN et SCHROEDER. — *Loc. cit.*

(4) ILLOWAY. — Einfache Methode zur quantitativen Bestimmung der vom Magen ausgeschiedenen Enzyme. *Boas. Arch.*, XI, 144, 1905, d'ap. *Bioch. Ctb.*, IV, 109, 1905.

(5) JACOBY. — Ueber den Nachweis des Pepsins. Voir technique dans : KARL FLEICHER. Ueber neuere Methoden quantitativen Pepsinbestimmung. *Wiener. Klin. Woch.*, n° 48, 1907, d'ap. *Bioch. Ctb.*, VII, 87, 1908.

(6) FULD et LEVISON. — Die Pepsinbestimmung mittelst der Edestinprobe. *Bioch. Zeitsch.*, VI, 473, 1907.

(7) O. GROSS. — Die Wirksamkeit des Pepsins und eine einfache Methode zu ihrer Bestimmung. *Bert. Klin. Woch.*, XLV, 643, 1908.

FULD et LEVISON se servent d'édestine cristallisée retirée des semences de chanvre. On fait une solution au millième de cette édestine. Le volume de suc gastrique ou de solution de pepsine qui en une 1/2 heure digère l'édestine, si bien qu'il ne se fait plus de précipité par le chlorure de sodium, renferme l'unité de ferment.

O. GROSS détermine le volume de solution fermentaire qui en 1/4 d'heure à 40° transforme 0 gr. 01 de caséine en caséoses imprécipitables par l'acide acétique. Ce volume de solution renferme l'unité de pepsine.

Je groupe avec ces procédés une méthode inspirée par l'essai officinal des pepsines médicinales, et adaptée à la détermination du titre exact de celles-ci. Elle a été bien développée par M. MACQUAIRE (1).

La matière protéique mise en œuvre est la fibrine, soit fraîchement essorée, soit — et mieux — desséchée à basse température. Mais il faut d'abord définir ce qu'on entend ici par le titre d'une pepsine.

Le titre d'une pepsine exprime le nombre de grammes de fibrine fraîche qu'un gramme de cette pepsine est — en six heures, à 50°, et dans des conditions données d'acidité — susceptible de transformer en produits incoagulables par l'acide azotique.

On dit d'une pepsine que son titre limite est 50 lorsqu'elle est, dans les conditions spécifiées, capable de digérer au plus 50 fois son poids de fibrine. C'est-à-dire qu'une pepsine de titre 50, par exemple, doit, à la dose de 0,200, pouvoir digérer 10 grammes de fibrine fraîche.

Ceci posé, veut-on déterminer la force exacte d'une pepsine dont on suppose le titre voisin de 50. On procède ainsi :

Dans 5 flacons, 1, 2, 3, 4, 5, on introduit :

Fibrine lavée fraîchement essorée.....	10 gr.
(ou mieux, fibrine desséchée à basse température, Méthode MACQUAIRE (2).....	2 gr. 50
Acide chlorhydrique à 1 %.....	60 gr.

et on place le tout au B.-M. jusqu'à ce que la température atteigne 50°, ce qui demande environ 20 minutes. Puis on cherche dans un tableau préalablement dressé les quantités de pepsine correspondantes aux

(1) P. MACQUAIRE. — Titrage des pepsines, *J. Ph. Ch.*, XVI, 289, 1902.

(2) P. MACQUAIRE. — De l'emploi de la fibrine desséchée et pulvérisée dans l'essai de la pepsine. *J. Ph. Ch.*, XII, 67, 1900.

titres 30, 40, 50, 60, 70, soit pour les 10 grammes de fibrine fraîche introduits dans l'essai, 0 gr. 33, 0 gr. 25, 0 gr. 20, 0 gr. 166, 0 gr. 142.

On introduit respectivement ces quantités dans les flacons 1, 2, 3, 4, 5. On maintient au B.-M. pendant 6 heures environ en agitant fréquemment au début, puis toutes les heures.

Après 6 heures de digestion, le contenu de chaque flacon est versé sur un filtre et 10 c³ du liquide filtré et parfaitement limpide sont versés dans un tube à essai.

On laisse tomber dans chaque tube refroidi à + 20° de l'acide azotique pur de D^m 1,39. Si 20 gouttes ne provoquent aucun précipité on en conclura que la pepsine essayée est d'un titre supérieur à 70. Si au contraire 20 gouttes d'acide azotique provoquent dans tous les tubes un précipité persistant, on en conclura que la pepsine essayée est d'un titre inférieur à 30.

Si, dans les tubes 1 et 2, 20 gouttes d'acide azotique ne provoquent aucun précipité, et si, au contraire, ils laissent un précipité très net dans les tubes n^{os} 3, 4 et 5, on en conclura que le titre de la pepsine est supérieur à 40 et inférieur à 50. Pour obtenir le titre réel, il suffira de faire avec cette pepsine dix nouveaux essais de 40 à 50 de la même façon que précédemment.

* *

d) *Méthodes basées sur la fixation d'acide par les substances protéiques, en présence de pepsine.*

Sur un principe tout à fait différent reposent les méthodes qu'il nous reste à examiner.

Lorsqu'on fait digérer une matière protéique dans une solution chlorhydrique en présence de pepsine, il se fixe sur l'albuminoïde de l'acide chlorhydrique et ceci d'autant plus que la solution contient plus de pepsine.

La méthode du D^r L. MEUNIER (1) consiste à faire digérer la caséine dans le suc gastrique dont on cherche la valeur en pepsine, à calculer la teneur en acide chlorhydrique libre avant et après la digestion, et déduire de l'acide chlorhydrique ainsi utilisé la valeur en pepsine du suc gastrique.

Cette méthode qui permet de comparer les valeurs des éléments chlorés et de la pepsine d'un suc gastrique évalués avec une même quantité peut avoir un certain intérêt clinique.

(1) L. MEUNIER.— Recherche quantitative de la pepsine dans le suc gastrique. B. S. P., III, 392, 1901.

La méthode de VOLLHARDT (1), étudiée par LÖHLEIN (2), KÜTTNER (3), etc., s'inspire d'un même principe. C'est une combinaison des méthodes de THOMAS et WEBER et de MEUNIER.

On voit combien ces méthodes sont diverses et combien variable l'unité conventionnelle de pepsine.

Pour mesurer l'activité pepsique, on mesure : ici, la longueur du cylindre d'albumine digéré — ici, le temps de dissolution d'un poids donné de substance protéique — ailleurs, le taux d'azote total solubilisé — ailleurs la dose minima de ferment, qui, en un temps limité, peptonise telle dose de fibrine, etc.

Il n'est pas besoin d'insister pour conclure qu'il est d'un très grand intérêt de voir ces méthodes comparées et que l'unification s'impose.

A ce point de vue, il faut signaler la thèse de WOJWODOFF (1), qui a particulièrement comparé les techniques de GRÜTZNER, de METT et de VOLLHARDT, et les a trouvées sensiblement concordantes.

*
* *

La loi d'action de la pepsine s'est dégagée des expériences de E. SCHÜTZ (4), puis de BORISSOW (6). Par des voies différentes (SCHÜTZ employait la méthode polarimétrique, BORISSOW la méthode des tubes de METT), ces auteurs sont arrivés à une constatation identique : « *Les quantités de pepsine de divers sucs sont entre elles comme les carrés des vitesses de digestion* », c'est-à-dire comme les carrés de millimètres d'albu-

(1) VOLLHARDT. — Ueber eine neue Methode der quantitativen Pepsinbestimmung nebst Bemerkungen über die Tryptophanreaction und das Plastein bildende Ferment. *Münch. med. Woch.*, 49, 1903.

(2) LÖHLEIN. — Ueber die Vollhardtsche Methode der quantitativen Pepsin und Trypsinbestimmung durch Titration. *Hofm. Beitr.*, VII, 120, 1905.

(3) KÜTTNER. — Ueber die Vollhardtsche Pepsinbestimmung. *Z. ph. Ch.* LII, 63, 1907.

(4) WOJWODOFF STOJAN. — Ueber die Methoden der Pepsinbestimmung und das Fermentgesetz. Diss., Berlin, 1907.

(5) E. SCHÜTZ. — Methode zur Bestimmung der relativen Pepsinmengen. *Z. ph. Ch.*, IX, 577, 1890.

(6) P. BORISSOW. — Diss. Petersbourg, 1891, cité d'ap. PAWLOW.

mine qui ont été digérés dans un même temps par les sucs. Soit un exemple numérique de cette loi.

« Si un liquide a digéré 2 millimètres d'albumine et un autre 3 millimètres dans le même temps, les quantités relatives de pepsine contenues dans ces liquides ne sont pas comme 2 et 3, mais comme les carrés de ces nombres, c'est-à-dire comme 4 et 9 » (4).

La même loi peut être formulée sous cette autre forme :

La vitesse de digestion est proportionnelle à la racine carrée de la quantité de ferment.

JULIUS SCHÜTZ (1) a vérifié la loi de SCHÜTZ-BORISSOW. Elle est exacte pour les solutions de ferment de moyenne concentration et en présence d'un excès de la substance protéique.

Cette loi n'est d'ailleurs pas aussi simple qu'il a paru tout d'abord.

HUPPERT et SCHÜTZ (2) ont vu que la rapidité de la réaction est directement proportionnelle à la quantité de l'albumine, à la racine carrée de la quantité de ferment, du temps, de la concentration de l'acide.

La formule suivante exprime alors cette loi ;

$$q = K \cdot A \sqrt{f \cdot t \cdot a.}$$

q représente la quantité d'albumoses produite.

A la quantité d'albumine.

f la quantité de pepsine.

t la durée de l'essai.

a la concentration de l'acide.

K est une constante qui dépend de l'acide, de la nature de la pepsine, de la température.

Il ne semble d'ailleurs pas que cette loi soit définitive, et des expériences récentes tendent à l'infirmier sur divers points.

(Voir, p. ex., O. Gross, *loc. cit.*).

(1) PAWLOW. — *Loc. cit.*

(2) JULIUS SCHÜTZ. — Zur Kenntniss der quantitativen Pepsinwirkung. *Z. ph. Ch.*, XXX, 1, 1900.

(3) H. HUPPERT et E. SCHÜTZ. — Über einige quantitative Verhältnisse bei der Pepsinverdauung. *Pflüg. Arch.*, LXXX, 470, 1900.

SOUS-CHAPITRE IV.

Applications pharmaceutiques de la pepsine.

§ 1. La Pepsine aux Codex français de 1866, 1884, 1908.

La découverte du rôle physiologique de la pepsine et de méthodes pratiques d'extraction de ce ferment soluble, devait inspirer la pensée d'utiliser en thérapeutique les propriétés de ce ferment.

C'est surtout aux expériences et aux publications faites par CORVISART, de 1851 à 1854, qu'est due en France la généralisation de son emploi thérapeutique.

La pepsine figure au Codex français depuis 1866.

L'édition de la Pharmacopée de 1866 désigne sous le nom de *pepsine médicinale* une pepsine *en pâte* dont elle précise la préparation.

Voici, en peu de mots, quelle était cette préparation : On faisait macérer pendant 2 heures dans l'eau à 15° les membranes internes de caillottes de moutons. Le macéré était additionné d'acétate neutre de plomb. Le précipité lavé, mis en suspension dans l'eau était décomposé par l'hydrogène sulfuré ; liqueur et précipité étaient jetés sur des filtres et le liquide filtré était évaporé dans des vases peu profonds à une température inférieure à 45°. Cette méthode est, à quelques détails près, celle que BOUDAULT (1) avait indiquée en 1854. Elle donnait un modeste rendement : 125 gr. pour 500 caillottes. Le produit était d'un prix de revient élevé et d'une

(1) BOUDAULT. — *Moniteur des Hôpitaux*, 16 février 1854. V. aussi « Mémoire sur la pepsine », *J. Ph. Ch.*, 3^e S., XXX, 161, 1864.

activité médiocre. Cette pepsine médicinale était une pâte ferme, de couleur blonde, d'un goût acidule et d'une odeur spéciale n'ayant rien de putride. Elle devait dissoudre 40 fois son poids de fibrine blanche, humide mais non mouillée.

En dehors de cette « fibrine médicinale », le Codex de 1866 signale une *pepsine commerciale*, dite « *pepsine acide amy-lacée* », qui est un mélange de pepsine médicinale, d'amidon et d'acide tartrique. Il admet que cette pepsine amy-lacée est bonne lorsqu'elle présente le titre 6.

L'article relatif à la Pepsine du Codex de 1866 avait été rédigé à la suite d'un important travail élaboré par une Commission de la Société de pharmacie de Paris, dont GUIBOUT était le rapporteur (1).

Le Codex de 1866 ne prévoyait aucune préparation officinale dont la pepsine dût être la base.

En 1884, le Codex ne prescrit plus aucun mode de préparation. C'est qu'en effet cette préparation ne peut guère être faite dans le laboratoire du pharmacien, elle est purement industrielle, et comme l'a justement écrit VIGIER (2), chargé à titre de membre de la Commission du Codex d'étudier les médicaments à base de ferments digestifs, il n'y a pas lieu de l'insérer dans une Pharmacopée.

Avec cette édition du Codex le sens des mots « *pepsine médicinale* » change complètement. La pepsine médicinale est une *poudre* d'un blanc grisâtre, *mélange de pepsine extractive et d'amidon* ; c'est la *pepsine extractive* qui répond à la pepsine médicinale de 1866 et le Codex de 1884 spécifie qu'elle peut être retirée des estomacs de porc ou de caillottes de mouton ou de veau. La pepsine médicinale de 1884 doit être au titre 20 et la pepsine extractive au titre 50.

Enfin cette édition de notre Pharmacopée formule un vin et un élixir de pepsine.

(1) Rapport sur la pepsine fait à la Société de Pharmacie de Paris par une commission composée de MM. GUIBOUT, BOUDET, BOUDAULT, REGNAULD, auxquels se sont joints M. BUSSY et M. le Dr LUCIEN CORVISART. *J. Ph. Ch.* (4^e S.) II, 81, 1865.

(2) P. VIGIER. — Des ferments digestifs. Extrait de la *Gazette hebdomadaire de médecine et de chirurgie*, 1885.

Le Codex de 1908, après avoir défini la pepsine « un ferment soluble qui, en milieu acide, possède la propriété de transformer les albuminoïdes en peptones » et sans avoir spécifié quelle doit être son origine, dit que « la pepsine » se présente sous forme de pâte épaisse, de poudre, de paillettes translucides ou opaques, de couleur jaunâtre », ces trois formes dépendant du mode d'évaporation ou de dessiccation.

Le nouveau Codex n'emploie plus le terme pepsine médicinale. Il admet le mélange de la pepsine avec l'amidon (*pepsine amyglacée*), ou avec le sucre de lait (*pepsine lactosée*). La pepsine doit être au titre 100 et les pepsines amyglacée et lactosée au titre 40.

Au Codex de 1908, la pepsine est la base d'un élixir, mais elle n'entre plus dans aucun vin médicinal. Elle est utilisée dans la préparation du « soluté de peptonate de mercure ».

Telle est, brièvement résumée, l'histoire en quelque sorte officielle de la pepsine.

Au point de vue exclusivement professionnel où nous nous plaçons dans ce chapitre, deux points doivent retenir notre attention :

- 1° l'essai de la pepsine officinale ;
- 2° les préparations dont elle est la base.

§ 2. *Essai des pepsines officinales.*

Nous avons déjà eu l'occasion de le dire, ce qui importe surtout au pharmacien, ce n'est pas de mesurer l'activité *exacte* d'une pepsine, mais c'est de vérifier si une pepsine donnée répond aux conditions de *titre minimum* exigé par la pharmacopée. On l'a vu tout à l'heure, les exigences du Codex se sont progressivement élevées, au fur et à mesure que se perfectionnaient les méthodes industrielles fournissant des pepsines de plus en plus actives. La pepsine extractive a dû répondre successivement aux titres 40, 50 et actuellement 100 et chacun des Codex de 1866, 1884, 1908 a indiqué les moyens de vérifier les titres imposés.

Les techniques d'essai sont allées se modifiant et se perfectionnant elles-mêmes et il nous faut examiner avec détail sur quels points.

1° *Choix de la matière protéique.*

La première question à envisager est relative au choix de la substance protéique à introduire dans l'essai.

C'est CORVISART, puis GUIBOUT, au nom de la Commission de la Société de Pharmacie, à laquelle j'ai déjà fait allusion, qui proposèrent l'emploi de la *fibrine* du sang.

C'est la *fibrine fraîche* « *humide mais non mouillée* » dont l'emploi est prescrit par le Codex de 1866. Le Codex de 1884 est plus précis quand il formule « *fibrine de porc lavée et fraîchement essorée* ».

La fibrine est facilement et rapidement attaquée par la pepsine et c'est la raison qui a dicté le choix des rédacteurs du Codex. Mais il faut reconnaître que pratiquement il n'est pas aisé au pharmacien, de se procurer, au moment voulu, la fibrine nécessaire à un essai. Sans doute cette substance protéique peut être conservée soit dans la glycérine, soit dans l'eau chloroformée, soit dans une solution concentrée de chlorure de sodium, mais la conservation de la fibrine dans ces conditions n'est pas illimitée (1) et des essais faits à intervalles plus ou moins éloignés avec cette fibrine ne sont pas comparables. Aussi comprend-on que divers pharmacologistes aient tenté de lui substituer le *blanc d'œuf* frais, liquide ou coagulé. Il est facile de s'en procurer en tout moment et sa composition est suffisamment uniforme pour que cette substitution paraisse avantageuse.

Les pharmacopées étrangères ont, à peu d'exceptions près, adopté l'*albumine d'œuf*. C'est le cas des pharmacopées même les plus récentes: Ph. anglaise (1898), allemande (1900), ita-

(1) Je fais allusion aux phénomènes d'autodigestion de la fibrine en milieu antiseptique. Ils ont été étudiés par plusieurs savants; on connaît en particulier les faits de « digestion saline » observés par M. DASTRE. M. V. HARLAY, qui a étudié l'autodigestion de la fibrine en présence de chloroforme, pense qu'il s'agit en réalité d'une digestion trypsique provoquée par un ferment fixé sur la fibrine (*Thèse Doct. Ph.*, Paris, 1900).

lienne (1902), des Etats-Unis (1905), belge (1906), autrichienne (1906), helvétique (1907).

La pharmacopée espagnole (1905) prescrit, comme le Codex français, l'emploi de la fibrine.

Pour rejeter, chez nous, l'emploi du blanc d'œuf, on a fait valoir sa moindre facilité d'attaque par la pepsine lorsqu'il est coagulé, et le peu de commodité de sa manipulation lorsqu'il est crû.

L'ovalbumine coagulée peut cependant se prêter aux essais de digestion, mais à certaines conditions. La première est qu'elle n'ait pas été soumise à une cuisson trop prolongée. On a bien des fois avancé que le blanc d'œuf est d'autant plus facilement attaqué par le ferment gastrique qu'il a été moins longtemps cuit. C'est ce qu'a encore observé dans un travail récent M. BRANCAZ (1).

En immergeant un œuf dans l'eau bouillante pendant 5 minutes seulement, le blanc est suffisamment consistant pour être lavé, pulvé et passé au tamis et il se laisse aussi facilement peptoniser que la fibrine. Si l'on prolonge la cuisson 10 minutes, on observe un retard notable dans la peptonisation. Ces constatations paraissent suffisantes pour expliquer l'avis des auteurs qui ont opéré avec de l'ovalbumine très longuement cuite, tel M. A. PETIT, dont les essais ont été pratiqués avec des blancs d'œufs maintenus une 1/2 heure dans l'eau bouillante. L'état de division de la substance joue un rôle également important et les résultats sont très dissemblables suivant que le blanc d'œuf a été divisé en cubes, passé à travers une passoire ou pulvé à travers un tamis. M. VIGIER, qui a développé ce dernier point a de plus attiré l'attention sur ce fait que l'albumine coagulée, abandonnée à elle-même, devient de moins en moins facilement attaquant par la pepsine, si bien que les résultats varient suivant le temps qui s'écoule entre la préparation du blanc d'œuf coagulé et la mise en route de l'essai. M. HARLAY, puis M. DISDIER (2) ont employé dans leurs essais de l'albumine coagulée par la chaleur en présence d'un acide. C'est sous cette

(1) E. BRANCAZ. — Contribution à l'étude du titrage de la pepsine pharmaceutique. *Thèse Doct. Ph.*, Lyon, 1906.

(2) *Loc. cit.*,

forme qu'elle est le mieux divisée et le plus facilement attaquable.

Voici, d'après ce dernier auteur, le mode de préparation de cette albumine :

On délaye 100 gr. de blanc d'œuf dans 10 fois leurs poids d'eau, c'est-à-dire dans 1000 c³ d'eau distillée. On a soin, au préalable, de le diviser par battage. Puis la solution est portée au b.-m. vers 80°. Comme la coagulation est lente à se produire par suite de l'alcalinité de l'albumine, on ajoute, pour favoriser la formation du précipité, un certain nombre de centimètres cubes de solution d'acide acétique à 1 0/0.

La proportion de solution acide à ajouter pour précipiter 100 gr. d'albumine s'élève à 45 c³. L'acide acétique, n'est d'ailleurs pas le seul acide capable de provoquer la coagulation de la matière protéique. Tous les autres, soit minéraux, soit organiques, jouissent de propriétés analogues. Mais les quantités nécessaires pour précipiter 100 gr. d'albumine varient suivant les poids équivalentaires de ces acides.

La matière albuminoïde ainsi précipitée, est recueillie sur un filtre et lavée jusqu'à réaction neutre des eaux de lavage. Puis on la dessèche dans du papier buvard jusqu'à ce que son poids soit égal au poids du blanc d'œuf primitivement employé.

On pourrait penser, pour les essais officinaux, à la *caséine* que l'on extrait facilement du lait. Plusieurs auteurs ont effectivement songé à son emploi, mais n'ont obtenu que de médiocres résultats. M. BRANCAZ, qui l'a utilisée à l'état humide et à l'état sec a réalisé des digestions satisfaisantes, mais, humide, son degré d'hydratation est trop variable, et, sèche, sa digestibilité varie trop suivant son mode de dessiccation pour qu'elle soit sérieusement recommandable.

La *gélatine* se trouve couramment dans les officines, mais elle n'est pas très facilement digérée par la pepsine et des raisons théoriques militent d'ailleurs en faveur de son rejet. Il faut donc revenir à la fibrine, bien que le pharmacien ne puisse ni se la procurer commodément, ni la conserver facilement. Or on peut faire à la fibrine, telle que la pharmacopée de 1884 en prescrivait l'emploi, un reproche grave.

L'essorage de la fibrine fraîche permet d'y laisser une quantité d'eau variable, suivant la pression plus ou moins puissante de la main de l'opérateur.

M. MACQUAIRE, en faisant essorer par des mains différentes

des fibrines de différentes provenances, a constaté « qu'on pouvait leur enlever, par simple expression, de 70 à 80 % d'eau, c'est-à-dire que ces fibrines desséchées, après essorage effectué dans des conditions qui ont varié de la main d'une femme à celle d'un homme robuste, ont laissé un résidu sec qui a varié de 20 à 30 %. Il en résulte évidemment qu'une même pepsine titrée avec une fibrine chargée d'eau sera excellente, alors qu'elle sera mauvaise si on a employé pour évaluer son titre une fibrine fortement essorée. La variation est encore plus considérable si l'on essore la fibrine entière ou si on l'essore après l'avoir hachée menue ». M. MACQUAIRE (1) a très élégamment résolu la question, en montrant que la fibrine desséchée à basse température (40° au plus) conserve toutes les propriétés de la fibrine fraîche ; qu'elle est aussi facilement attaquable par la pepsine et qu'elle peut être conservée indéfiniment.

« La fibrine de porc, lavée, essorée à la main, desséchée à 40° à l'étuve d'Arsonval ou simplement dans un courant d'air sec présente un aspect corné ; elle est cassante et se pulvérise facilement au mortier. La poudre grossièrement tamisée et enfermée dans un flacon fermé se conserve indéfiniment sans altération. Elle représente un produit parfaitement défini, de manipulation facile et toujours identique à lui-même ».

20 gr. de fibrine lavée et essorée fournissent en moyenne 2 gr. 50 de fibrine sèche.

Le Codex de 1908 a consacré l'emploi de la *fibrine desséchée* pour l'essai de la pepsine. Dans son annexe « Réactifs et solutions titrées », il spécifie qu'il s'agit de *fibrine de porc lavée, essorée à la main, desséchée à 40°, soit à l'étuve, soit dans un courant d'air sec puis pulvérisée*.

Ces précisions ne sont pas inutiles, car le commerce livre des fibrines desséchées, qui l'ont été sans précautions spéciales, à haute température et qui ne répondent pas au but qu'on se propose, tels les échantillons essayés par M. BRANCAZ (1).

2° Acide et taux d'acidité.

Le Codex de 1866 prescrivait d'acidifier le milieu digestif par l'acide lactique, les Pharmacopées de 1884 et de 1908 prescrivent l'acide chlorhydrique qui est l'acide normal de la sécrétion

(1) P. MACQUAIRE. — De l'emploi de la fibrine desséchée et pulvérisée dans l'essai de la pepsine. *J. Ph. Ch.* [6° S], XII, 67, 1900.

gastrique. Le taux d'acide est dans l'essai de 1884 sensiblement de 3 gr. d'acide chlorhydrique pour $\frac{0}{100}$; dans l'essai de 1908 de 2,50 $\frac{0}{100}$. Je ne reviens pas ici sur la question du taux d'acidité le plus favorable à la digestion pepsique, question mal élucidée malgré les nombreux travaux auxquels elle a donné lieu, les auteurs s'étant placés dans des conditions expérimentales si diverses que leurs conclusions ne sont valables que pour ces conditions mêmes.

M. F. DISDIER, dans sa thèse, a apporté à cette étude une intéressante contribution.

Ce qui importe ici, c'est que la nature et le taux de l'acide soient nettement déterminés.

3° *Dilution.*

Il est très important que l'essai de la pepsine officinale soit pratiqué dans des conditions de dilution toujours identiques; l'activité d'une pepsine, — sa quantité et celle de la substance protéique restant constantes — varie avec le volume d'eau chlorhydrique dans lequel s'effectue la digestion. On voit, par exemple, dans une expérience de M. MACQUAIRE, le pouvoir peptonisant d'une pepsine passer de 17 à 150, suivant la dilution, le pouvoir peptonisant étant en raison inverse de la densité du milieu digestif.

Le Codex de 1884 faisait faire l'essai avec 60 gr. d'eau, et si l'on ajoute l'eau d'hydratation de la fibrine et de l'acide, ce chiffre est porté à 68 gr. environ

Le Codex de 1908 conserve le chiffre de 60 gr., mais en tenant compte de l'accroissement de dilution qu'apporte d'une part l'acide, d'autre part la fibrine quand elle est employée à l'état humide.

Les chiffres sont alors 58,50 d'eau distillée plus 1 gr. 50 d'acide chlorhydrique dilué dans l'essai avec 2 gr. 50 de fibrine sèche et 51 gr. seulement d'eau plus 1 gr. 50 d'acide chlorhydrique dilué dans l'essai avec 10 gr. de fibrine humide.

4° *Température.*

On sait trop l'importance de ce facteur dans les actions diastatiques pour insister sur la nécessité de le fixer exactement

(1) Thèse citée.

dans l'essai officinal. Le Codex de 1866 avait été très imprécis. Il se contentait de dire : la température ne doit pas dépasser 45°C.

Les pharmacopées de 1884 et 1908, plus précises, disent que la température doit être maintenue à 50°.

5° *Durée de l'essai.*

La fixation en est évidemment conventionnelle. On peut faire varier le temps de l'essai en augmentant ou diminuant la dose de pepsine.

Il faut fixer à l'essai une durée qui rende pratique l'opération. La digestion était de 12 heures au Codex de 1866, elle est de 6 heures à ceux de 1884 et de 1908.

6° *Terme de la digestion.*

Ce n'est pas à proprement parler le terme de la digestion qu'il s'agit d'apprécier ; il importe seulement d'en apprécier conventionnellement la fin au moyen d'une réaction simple, correspondant à un stade aussi bien défini que possible de la digestion pepsique ; on admet dans l'essai officinal que la digestion est terminée lorsqu'il ne se fait plus de précipité par addition d'acide azotique ; ce terme correspond sensiblement à la disparition des albumoses primaires.

Le Codex de 1866 notait incidemment, que dans le liquide de digestion « l'acidenitrique ne forme pas de précipité à froid ». Mais il n'insistait pas sur l'importance de l'épreuve azotique.

Plus précis, le Codex de 1884 dit : 10 c³ de la liqueur refroidie et filtrée *ne devront* pas se troubler par l'addition de 20 à 30 gouttes d'acide azotique, et la nouvelle pharmacopée dit à peu près dans les mêmes termes, que 10 c³ de la liqueur filtrée « *ne doivent pas à la température ordinaire, se troubler par l'addition de 20 gouttes d'acide azotique officinal* ». Le volume de la liqueur à utiliser, sa limpidité, sa température, le nombre de gouttes d'acide à ajouter ne sont pas des détails insignifiants ; on en sent la valeur sans qu'il soit nécessaire de développer chacun de ces points.

On ne trouve pas le même souci de précision dans les pharmacopées étrangères. Plusieurs d'entre elles — on se rappelle

que presque toutes emploient l'albumine d'œuf coagulée — se bornent à constater la *dissolution* de cette protéine au bout d'un temps donné.

Telles sont les pharmacopées anglaise, allemande, autrichienne, belge.

La pharmacopée suisse prescrit de maintenir le mélange à 40° en agitant fréquemment; après une ou deux heures au plus, l'albumine doit être dissoute à l'exception de quelques flocons jaunâtres. Si l'on fait digérer le mélange pendant 5 heures encore, quelques cc³ du liquide doivent tout au plus être légèrement troublés par l'addition de 20 à 30 gouttes d'acide azotique dilué.

La pharmacopée des Etats-Unis donne une technique d'essai compliquée et fait mesurer dans une éprouvette graduée, la hauteur du dépôt d'albumine non dissoute en un temps donné.

Sans entrer plus avant dans cet examen, on voit que les pharmacopées étrangères ne sont ni aussi exigeantes, ni aussi précises que notre Codex. Si l'on ajoute à cela que les conditions de température, de dilution, d'acidité, varient de l'une à l'autre, on voit que l'unification s'impose.

7° Conduite de l'essai.

Le Codex (1908) fait mélanger la fibrine, l'eau et l'acide et n'introduit la pepsine qu'au moment où le tout est en équilibre de température avec l'air de l'étuve ou l'eau du bain-marie. C'est qu'en effet, en présence d'HCl, la pepsine subit une diminution d'activité, diminution d'autant plus grande que le temps de contact est plus prolongé, si bien qu'il y a avantage à n'introduire la pepsine qu'au moment où la liqueur chlorhydrique est amenée à la température à laquelle la digestion doit-être opérée. C'est un point qu'avait bien développé M. DISDIER.

..

En résumé : *Elévation du titre minimum de la pepsine. — Emploi de fibrine desséchée. — Plus de précision dans les conditions de dilution du mélange digestif, dans la marche de l'essai, dans l'épreuve azotique* —, tels sont les perfectionnements apportés à l'essai de la pepsine par le Codex de 1908.

Pour conclure, je rapporte le texte de cet essai :

« La pepsine doit répondre à l'essai suivant :

Pepsine : dix centigrammes.....	0,10
Eau distillée : cinquante-huit grammes cinquante centigrammes..	58,50
Acide chlorhydrique dilué : un gramme cinquante centigrammes..	1,50
Fibrine desséchée (R) deux grammes cinquante centigrammes.....	2,50

Dans un flacon à large ouverture, introduisez la fibrine, l'eau distillée et l'acide chlorhydrique dilué; placez ensuite ce flacon dans une étuve ou un bain-marie chauffé à + 50°, jusqu'à ce que le mélange ait atteint la même température; ajoutez alors la pepsine et faites digérer pendant six heures en ayant soin, au début, d'agiter fréquemment jusqu'à dissolution complète de la fibrine, et ensuite toutes les heures environ.

Laissez refroidir et filtrez.

10 cent. cubes de la liqueur ainsi obtenue ne doivent pas à la température ordinaire se troubler par l'addition de vingt gouttes d'acide azotique officinal.

Dans cet essai, on peut remplacer la fibrine *desséchée* par 10 grammes de fibrine essorée (R); il faut alors réduire à 51 grammes la proportion d'eau distillée.

§ 3. *Préparations de pepsine*

Sous ce titre, il faut d'abord citer les mélanges de pepsine extractive et d'amidon ou de sucre de lait qui figurent au Codex de 1908. Ces préparations doivent, à la dose de 0 gr. 25, répondre à l'essai officiel, c'est-à-dire qu'elles doivent être au titre 40. La pepsine amyliacée, dite *médicinale*, du Codex de 1884, était au titre 20.

C'est BOUDAULT qui préconisa le premier, pour faciliter la conservation de la pepsine, son mélange avec de l'amidon grillé ou séché à 100°. La poudre nutritive neutre de CORVISART et BOUDAULT n'était pas autre chose qu'un tel mélange. Elle pouvait digérer six fois son poids de fibrine fraîche.

La poudre nutritive acide était le même produit acidifié par addition d'acide lactique ou encore d'acide tartrique ou citrique. Les mêmes auteurs employaient encore la même poudre additionnée de 0 gr. 01 de chlorhydrate de morphine ou 0 gr. 01 de codéine ou 0 gr. 003 de strychnine par paquet.

Les médecins prescrivent souvent des cachets où la pepsine est associée à des médicaments alcalins. Cette association ne

paraît pas très heureuse. J'en dirai autant de l'association de la pepsine et de ferments comme la pancréatine ou la papaïne que l'action pepsique détruit. La pharmacopée des États-Unis signale l'incompatibilité de la pepsine et de la pancréatine.

Un mot suffira pour condamner la forme pilulaire ou capsulaire qui ne s'applique pas à un médicament qui doit intervenir rapidement dans la digestion gastrique.

Restent les formes liquides.— La forme de sirop composé a eu quelque vogue au début de la médication pepsique. On incorporait la pepsine à du sirop de cerises ou du sirop d'écorces d'oranges. Mais ces préparations étaient naturellement très fermentescibles et ont été rejetées. Voici, à titre documentaire, la formule du sirop de pepsine de Boudault :

Pepsine amylacée.....	10 grammes
Eau distillée.....	30 —
Acide citrique.....	2 —
Sirop de cerises.....	170 —

Les vins de pepsine ont eu un succès moins éphémère. Le Codex de 1884 formulait le vin suivant :

Pepsine médicinale en poudre.....	50 gr.
Ou pepsine extractive.....	20 —
Vin de Lunel.....	1000 —

Délayez la pepsine dans le vin, laissez en contact pendant 24 heures. Filtrez.

Le Codex donnait un mode d'essai de ce vin calqué sur celui de la pepsine elle-même. 20 grammes de vin de pepsine (correspondant à 1 gramme de pepsine extractive) devaient peptoniser en 6 heures, à 50°, 10 grammes de fibrine fraîche, c'est-à-dire que le Codex admettait implicitement que la pepsine pouvait perdre par suite de son mélange avec le véhicule 50 % de son pouvoir peptonisant.

Le Codex de 1884 donnait également la formule d'un élixir de pepsine. C'était la suivante :

Pepsine médicinale en poudre.....	50 gr.
Ou pepsine extractive.....	20 —
Eau distillée.....	450 —
Alcool à 80°.....	150 —
Sirop simple.....	400 —

Huile essentielle de menthe ou autre pour aromatiser : Q. S.

Délayez la pepsine dans l'eau distillée, puis mêlez au sirop et à l'alcool dans lequel l'huile essentielle aura été dissoute. Laissez en contact pendant 24 heures. Filtrez.

L'essai de cet élixir devait être fait comme celui du vin de pepsine.

Quelle est la valeur de ces dernières préparations de pepsine, vin et élixir?

C'est une question que les pharmacologues ont très vivement discutée.

Les promoteurs de la médication pepsique prescrivaient couramment des élixirs.

On connaît ceux de CORVISART, DE MIALHE, dont les formulaires rappellent la composition. Il est inutile de transcrire ici leur formule.

L'étude critique de ces formes pharmaceutiques a été faite par M. THIBAUT, et ce sont les conclusions de la thèse de ce pharmacien que je vais rappeler brièvement.

Le point qui domine la question est évidemment relatif à l'influence fâcheuse de l'alcool sur la pepsine. Or, bien qu'on ait plaidé l'innocuité de doses d'alcool allant jusqu'à 15 et 20 %, l'atténuation progressive de l'activité pepsique sous l'influence d'alcool même très dilué ne paraît pas douteuse ; cette atténuation progresse avec le degré alcoolique et peut aller jusqu'à l'anéantissement complet. Cette influence nocive de l'alcool est atténuée, du moins elle est rendue moins rapide, par la présence du sucre ; elle peut l'être encore par l'addition de glycérine, elle l'est aussi par l'augmentation de la quantité de ferment. M. THIBAUT pense que, d'une façon générale, *les vins et élixirs de pepsine sont de mauvaises préparations* et que la seule forme médicamenteuse assurée d'une conservation suffisante, est la pepsine en poudre. Pourtant, et il ne cache pas que c'est là une concession à des habitudes déjà anciennes, il préconise divers moyens pour améliorer les préparations de pepsine du Codex de 1884 : d'abord les ramener à une seule, en réduire le taux alcoolique ou même supprimer complètement l'alcool, assurer la stabilité du véhicule par des proportions convenables de glycérine et de sucre, augmenter la dose de pepsine, prolonger le plus longtemps possible et au moins 10 jours le contact de la pepsine et du véhicule.

Les rédacteurs du Codex de 1908 se sont inspirés de certaines de ces données quand ils ont inscrit dans la nouvelle pharmacopée la formule suivante :

Pepsine.....	20 gr.
Eau distillée.....	280 —
Vin de Lunel.....	500 —
Glycérine officinale.....	200 —

Délaissez la pepsine dans l'eau distillée, ajoutez le vin de Lunel, puis la glycérine. Mélangez et laissez en contact pendant 10 jours au minimum en agitant de temps en temps. Filtrez au moment du besoin.

Puis, visant la diminution d'activité de l'élixir au fur et à mesure qu'il vieillit, le Codex ajoute :

« L'activité de l'élixir diminuant avec le temps, on doit s'assurer qu'il répond toujours à l'essai suivant :

Essai. — Dans un flacon à large ouverture introduisez :

Elixir de pepsine	10 gr.
Eau distillée.....	55.50
Acide chlorhydrique dilué.....	2
Fibrine desséchée.....	2.50

Faites digérer pendant 6 heures au bain-marie ou à l'étuve à la température de 50° en ayant soin d'agiter fréquemment jusqu'à dissolution complète de la fibrine, puis ensuite toutes les heures environ ; laissez refroidir et filtrez.

10 c³ de la liqueur ainsi obtenue ne doivent pas se troubler à la température ordinaire, par addition de 20 gouttes d'acide azotique officinal.

Observation.— Dans cet essai on peut remplacer la fibrine desséchée (R) par 10 gr. de fibrine essorée (R) ; mais alors il faut réduire à 48 gr. la proportion d'eau distillée.

Parmi les préparations liquides de pepsine, il faut signaler les *solutions glycerinées* de ce ferment que les praticiens emploient pour la préparation extemporanée des médicaments magistraux. On peut se demander comment la pepsine se conserve en présence de ce dissolvant. Le travail de M. P. THIBAUT nous permet de répondre à cette question. La glycérine pure à 30° constitue un mauvais dissolvant de la pepsine sèche. Les solutions aqueuses de pepsine additionnées de glycérine conservent d'autant mieux leur activité, que la quantité de glycérine est moindre. Toutefois une proportion de 20 à 25 % de

glycérine reste sans action nuisible pendant plusieurs mois (au moins neuf). Le meilleur véhicule glyciné est alors, d'après M. P. THIBAUT :

Glycérine 50 gr., eau distillée 200 gr., ou glycérine 50 gr., eau chloroformée 200 gr.

La deuxième formule offre l'avantage d'empêcher l'envahissement des solutions par les microorganismes, mais on ne peut introduire sans prescription particulière du chloroforme dans une préparation magistrale, ce qui conduit à la rejeter.

Si quelques-unes des conclusions de M. P. THIBAUT, notamment celles qui ont trait à l'influence de l'alcool, ont soulevé des polémiques contradictoires, la plupart ont été corroborées par les travaux d'autres expérimentateurs; citons, par exemple, ceux de M. A. FISCHER (1) qui, vers la même époque, a fait l'étude pharmacologique des préparations de pepsine.

Les plus logiques des préparations de pepsine sont peut-être celles où l'on offre au malade la diastase dans son milieu naturel, c'est-à-dire le *suc gastrique* lui-même.

La *gastérine* du D^r FRÉMONT est du suc gastrique de chien recueilli par fistule. C'est un liquide limpide, peu coloré, très fortement acide, doué d'un grand pouvoir protéolytique.

Le suc gastrique de porc a été introduit en thérapeutique par le D^r HEPP.

(1) A. FISCHER. *Dissert-Dorpat*. 1901.

CHAPITRE II.

TRYPSINE.

SOUS-CHAPITRE PREMIER.

Protrypsine et Kinase. — Suc pancréatique et extraits pancréatiques.

§ 1. *Protrypsine et Kinase.*

Le suc pancréatique des Vertébrés agit à la fois sur les féculents qu'il saccharifie (VALENTIN), sur les matières grasses qu'il émulsionne (EBERLE) et saponifie (Cl. BERNARD), sur les substances protéiques qu'il transforme en peptones (CORVISART (1) et acides aminés. Cette triple propriété est rapportée à l'existence d'au moins trois ferments solubles dans la sécrétion pancréatique : une *amylase*, une *lipase* et une *protéase*. Il existe d'ailleurs d'autres diastases dans cette sécrétion ; citons la *maltase* et une *présure*.

Le ferment protéolytique qui, seul, doit nous occuper ici a été désigné sous le nom de *trypsine* par KÜHNE (2).

On a rapproché de la trypsine et l'on a parfois désigné sous ce même nom, un grand nombre de ferments protéolytiques

(1) CORVISART.— Sur une fonction peu connue du pancréas, Paris, 1857.

(2) KÜHNE.— *Verhandl. naturhist. Med. Ver. N. S. Heidelberg*, I., 1867.

rencontrés chez des Invertébrés, tels la trypsine du parenchyme des Spongiaires (KRUKENBERG) (1), l'actino-protéase des filaments mésentériques des Actinies bien étudiée par M. MESNIL (2), les ferments tryptiques trouvés dans des organes divers des Echinodermes (FREDERICQ (3), KRUKENBERG (4), CHAPEAUX (5), etc.), dans l'hépatopancréas ou le suc hépatique des Céphalopodes (BOURQUELOT (6), VICTOR HENRI (7), chez divers Insectes et Crustacés (KRUKENBERG (8), BIEDERMANN (9), etc.).

On trouve des ferments analogues à la trypsine dans la plupart des organes, la rate par exemple, dans les leucocytes, dans des liquides de l'organisme n'ayant aucune fonction digestive, comme l'urine, le lait.

On a décrit de nombreuses trypsines végétales.

Nous retrouverons quelques-uns de ces ferments. Disons seulement ici qu'on ne saurait les assimiler entièrement à la trypsine pancréatique et que le nom de trypsine ne peut leur être appliqué qu'à la condition d'en élargir le sens, et d'en faire une expression générique. Les trypsines seraient des ferments protéolytiques ayant leur optimum d'action à la neutralité ou à un taux variable d'alcalinité, transformant profondément les substances protéiques, donnant entre autres produits

(1) KRUKENBERG. — Über die Enzymbildung in den Geweben und Gefässen der Evertebraten. *Unters. d. phys. Inst. Heidelberg*, p. 339, II, 1882.

(2) F. MESNIL. — Recherches sur la digestion intracellulaire et les diastases des Actinies. *A. I. P.*, XV. 352, 1901.

(3) FREDERICQ. — Sur la digestion des albuminoïdes chez quelques Invertébrés. *Bull. Acad. de Bruxelles*, XLVI, 213, 1878, et *Arch. de Zool. exp.*, VII. 399, 1878.

(4) KRUKENBERG. — *Loc. cit.* et Nachtrag zu den Untersuchungen über der Ernährungsvorgang bei Coelenteraten und Echinodermen. *Même ouvrage*, p. 366, II, 1882.

(5) CHAPEAUX. — Sur la nutrition des Echinodermes. *Bull. Acad. de Bruxelles* [3^e S.], XXVI, 227, 1893.

(6) BOURQUELOT. — *Thèse citée*.

(7) V. HENRI. — Etude des ferments digestifs de quelques Invertébrés, *C. R. Biologie*, LV, 1316, 1903.

(8) KRUKENBERG. — Vergleichend. physiologische Beiträge zur Kenntnis der Verdauungsvorgänge. *Unters. d. physiol. Institut. Heidelberg*, p. 1, II, 1878, et *Zur Verdauung bei den Krebsen.*, *même recueil*, p. 261.

(9) BIEDERMANN. — Beiträge. zur vergleichenden Physiologie der Verdauung. *Pflüg. Archiv.*, LXXII, 105, 1898 ; LXXV, 43, 1899.

de décomposition de la leucine, de la tyrosine, du tryptophane ; elles s'opposeraient ainsi aux pepsines agissant seulement en milieu acide et poussant moins vite et sans doute moins loin la protéolyse.

*
* *

Dans ce chapitre nous n'étudierons que la *trypsine pancréatique* au point de vue chimique et pharmacotechnique, en laissant dans l'ombre, certaines des données, pourtant très importantes, dont, depuis le mémoire classique de CL. BERNARD sur le Pancréas, les physiologistes et les histologistes ont enrichi son histoire.

Il importe cependant de préciser sous quelle forme se trouve la trypsine dans les cellules glandulaires des acini pancréatiques, dites « cellules principales », et dans le suc pancréatique lui-même.

C'est qu'en effet ces cellules et ce suc *ne présentent pas le ferment sous forme active* : HEIDENHAIN (1) a montré que les cellules sécrétrices renferment non le ferment mais une substance capable de se transformer en trypsine, un zymogène, la *protrypsine* ou *trypsinogène*.

Le pancréas d'un animal qu'on vient de sacrifier mis *aussitôt* à macérer dans la glycérine fournit un extrait inactif sur l'albumine. Le pancréas frais, soumis avant la macération à l'action d'une solution étendue d'acide (acide acétique ou acide salicylique, par exemple), fournit un extrait glycériné actif. On a conclu de ce fait énoncé par HEIDENHAIN que les acides sont susceptibles d'opérer la transformation du trypsinogène en trypsine. Pourtant HEKMA (2) a montré que cette opinion n'est pas fondée. Les acides ne provoquent pas cette transformation dans le suc lui-même ou les extraits aqueux de pancréas.

Le *suc pancréatique* ne renferme lui aussi que le proferment, non le ferment. A l'état physiologique, il est non seulement peu actif (PAWLOW), mais encore *entièrement inactif* sur les protéiques. Pour le vérifier, il faut recueillir ce suc par cathété-

(1) HEIDENHAIN. — Beiträge zur Kenntnis des Pankreas, *Pflüg. Arch.* 557, 1875.

(2) HEKMA. — Sur l'influence des acides sur le dégagement de la trypsine au trypsinogène. *J. de Phys. et de Path. gén.*, VI, 25, 1904.

risme du canal de WIRSUNG chez un chien muni d'une fistule permanente d'HEIDENHAIN-PAWLOW ; il importe que le liquide ne soit pas souillé par la sécrétion du bourrelet de muqueuse qui entoure l'orifice fistulaire ; il importe aussi de perdre les premières gouttes du liquide écoulé. En opérant avec ces précautions, MM. DELEZENNE et FROUIN (1) ont mis en évidence l'absence complète de pouvoir protéolytique dans le suc pancréatique physiologique.

La transformation du trypsinogène en trypsine est effectuée par une substance qui paraît se rapprocher des ferments solubles.

PAWLOW et SCHEPOWALNIKOW (2), qui l'ont découverte, ont observé que le suc entérique du chien possède la propriété d'augmenter l'activité des trois principaux ferments du suc pancréatique et accroît, en particulier, avec une intensité surprenante l'activité protéolytique d'un suc peu actif. Le suc entérique bouilli a perdu cette propriété qu'ils ont rapportée à une diastase d'un type nouveau, à une diastase agissant sur une autre diastase pour l'activer.

Ce « ferment de ferment », ils l'appellent *entérokinase*.

M. DELEZENNE (3) a confirmé ces faits ; il a vu que l'entérokinase est affaiblie par un chauffage de 1/2 heure à 60° et complètement détruite dès 70-75° (4). Cette kinase se retrouve dans le suc entérique ou dans les macérations de muqueuse intestinale de tous les Vertébrés. Abondante surtout dans la portion duodéno-jéjunale de l'intestin, elle est produite par les plaques

(1) DELEZENNE et FROUIN. — La sécrétion physiologique du pancréas ne possède pas d'action digestive propre vis-à-vis de l'albumine, *C. R. Biologie*, LIV, 691, 1902.

(2) SCHEPOWALNIKOW. — La physiologie du suc intestinal. *Thèse Saint-Pétersbourg*, 1899.

(3) DELEZENNE. — L'action du suc intestinal dans la digestion tryptique des matières albuminoïdes. *C. R. Biologie*, LIII, 1161, 1901. — L'entérokinase et l'action favorisante du suc intestinal sur la trypsine dans la série des Vertébrés. *C. R. Biologie*, LIII, 1164, 1901.

(4) D'après MM. BIERRY et Victor HENRI (*C. R. Biologie*, LIV, 667, 1902), la macération intestinale chauffée à 120° pendant 20 minutes, conserve son pouvoir activant sur le suc pancréatique. L'activation n'est-elle pas dans cas le fait non de la kinase, mais du calcium qu'apporte le macéré intestinal ? (Voir plus loin).

de PEYER, organes lymphatiques riches en leucocytes. On la trouve en effet dans les leucocytes et dans les ganglions lymphatiques. Elle est également sécrétée par les microbes ; elle existe dans le venin des serpents (1). MM. DELEZENNE et MOUTON (2) l'ont caractérisée chez quelques Champignons Basidiomycètes. Enfin non seulement elle accroit l'activité tryptique d'un suc peu actif, mais *elle confère entièrement cette propriété au suc physiologiquement inactif*.

Cette activation des substances *purement chimiques* peuvent la produire.

M. LARGUIER DES BANCELS avait montré que de l'albumine coagulée imprégnée d'un colloïde (bleu de quinoléine) est digérée par le suc pancréatique, quand on additionne celui-ci d'un sel alcalino-terreux, *le concours du colloïde et de l'électrolyte paraissant indispensable* pour provoquer la protéolyse.

M. DELEZENNE (3), ayant observé qu'une macération de muqueuse intestinale dans une solution de fluorure de sodium ne possède plus le pouvoir kinasique, a été conduit à rechercher si les sels de chaux (que le FlNa précipite) n'interviennent pas dans le phénomène d'activation.

Il a pu effectivement mettre en évidence ce fait capital, que *le suc pancréatique inactif, additionné à dose convenable d'un sel soluble de calcium et porté à l'étuve acquiert à un moment*

(1) DELEZENNE.— Sur la distribution et l'origine de l'entérokinase.— Sur la présence dans les leucocytes et les ganglions lymphatiques d'une diastase favorisant la digestion tryptique des matières albuminoïdes. — Les kinases microbiennes. Leur action sur le pouvoir digestif du suc pancréatique vis-à-vis de l'albumine.— Sur l'existence d'une kinase dans le venin des serpents. *C. R. Biologie*, LIV, 281, 283, 998, 1071 (1902).

(2) DELEZENNE et MOUTON.— Sur la présence d'une kinase dans quelques Champignons Basidiomycètes. *C. R. Biologie*, LIII, 27, 1903.

(3) C. DELEZENNE. — Activation du suc pancréatique par les sels de calcium. — Sur le rôle des sels dans l'activation du suc pancréatique. — Spécificité du calcium. — Action des sels de calcium sur le suc pancréatique préalablement dialysé. — Sur l'activation du suc pancréatique par les sels de calcium. — Action antagoniste des sels de potassium. — Nouvelles observations sur la spécificité des sels de calcium dans la formation de la trypsine. — *C. R. Soc. Biologie*, LVII, 476, 478, 523, 614 (1905), 274 (1907).

donné la propriété de digérer énergiquement l'ovalbumine coagulée.

Cette activation ne se réalise qu'après un temps perdu plus ou moins considérable et se produit toujours brusquement.

Les sels de potassium exercent une action antagoniste, d'ailleurs purement temporaire, vis-à-vis de cette activation.

Cette curieuse propriété des sels de calcium est tout à fait spécifique. Les sels de Ba, Sr, Mg, ne peuvent leur être substitués. M. DELEZENNE a expliqué comment ces derniers peuvent, dans quelques cas, paraître eux-mêmes faiblement activants (1).

Un suc, une fois activé, ne perd plus son activité protéolytique si on le prive de son calcium.

Le calcium agit à dose infinitésimale. Il est bien difficile d'interpréter son intervention. M. DELEZENNE pense qu'il agirait non pas directement sur le trypsinogène mais sur une prokinase que renfermerait le suc pancréatique.

Quoi qu'il en soit, retenons que, pour disposer d'une trypsine active, il faut faire intervenir simultanément le suc pancréatique, disons de la protrypsine, et une substance activante, calcium ou kinase. Des comparaisons se présentent aussitôt à l'esprit, celle de l'action conjuguée de l'alexine et de la sensibilisation des immun-serums par exemple ; mais restons dans le domaine des diastases proprement dites. Dans les réactions oxydasiques, l'oxydation par l'oxygène moléculaire exige le concours de deux substances complémentaires : le manganèse et son support organique ; le complexe organo-manganésé constitue la laccase. Le manganèse est la complémentaire active, la matière organique à laquelle il est lié met l'élément minéral dans un état physique tel qu'il est particulièrement apte à provoquer des oxydations, c'est la complémentaire activante. — Dans le cas de la protéolyse pepsique on transporte facilement cette notion, qui paraît avoir une portée générale, en disant que l'acide représente la complémentaire active, la propepsine la complémentaire activante.

Dans le cas de la protéolyse trypsique, quelles sont les deux

(1) Cf. E. ZUNZ. — Recherches sur l'activation du suc pancréatique par les sels. *Bull. de la Société des Sciences médicales et naturelles de Bruxelles*, 8 janvier et 5 mars 1906.

complémentaires ? La protrypsine et la kinase, ou la protrypsine et le calcium ? Il ne semble pas que la comparaison soit possible entre l'action réciproque de ces deux substances et celle des deux complémentaires dans la laccase de G. BERTRAND. Ceci paraît encore plus difficile si l'on réfléchit que la trypsine fonctionne avec le maximum d'activité dans un milieu alcalin, renfermant, comme nous le verrons, une certaine quantité d'ions OH libres et que ceux-ci paraissent à bien plus juste titre devoir être considérés comme constituant la « complémentaire active » dans le système diastasique « trypsine ». Comment alors interpréter l'action de la kinase ? Ceci ne paraît pas simple.

La façon dont elle intervient dans la protéolyse tryptique a d'ailleurs donné lieu à des interprétations diverses. Pour HAMBURGER et HEKMA, BAYLISS et STARLING, etc., la kinase agit sur le proferment et le transforme en ferment ; cette transformation opérée, elle n'a plus de raison d'être, elle n'intervient plus dans la protéolyse.

Pour M. DELEZENNE, la kinase agit sur la substance protéique qu'elle imprègne et rend hydrolysable par la diastase. Pour MM. DASTRE et STASSANO (1), la kinase a un rôle plus directement actif, la digestion pancréatique est le fait *à la fois* de la substance que nous appelons *protrypsine* et de la *kinase*.

La protéolyse tryptique n'est pas une opération en deux actes, le premier réalise pendant le contact de la kinase et du suc pancréatique et donnant naissance au ferment actif « trypsine », acte auquel l'albumine serait étrangère, et un deuxième acte consistant dans l'action protéolytique de la trypsine. C'est une opération en un acte où interviennent simultanément 3 personnes, *protrypsine, kinase et albumine*.

* *

§ 2. *Suc pancréatique et extraits pancréatiques.*

Dans les laboratoires de physiologie, on se procure le suc pancréatique d'une façon permanente et en abondance par cathétérisme du canal de WIRSUNG (DELEZENNE et FROUIN) chez

(1) A. DASTRE et H. STASSANO. — Les facteurs de la digestion pancréatique. Suc pancréatique, kinase et trypsine, antikinase. *Arch. int. de Physiologie*, I, 86, 1904.

un chien muni d'une fistule permanente (HEIDENHAIN-PAWLOW). On provoque une sécrétion abondante en injectant au préalable dans le sang de l'animal 1 c³ d'une macération de muqueuse duodénale ou jéjunale dans l'acide chlorhydrique à 5 ‰. On admet que cette macération acide de muqueuse renferme l'*excitant spécifique de la sécrétion*, la *sécrétine* de BAYLISS et STARLING.

On obtient d'autre part une solution de *kinase* en recueillant le suc entérique lui-même chez un chien porteur d'une fistule de THIRY-VELLA. On obtient encore une solution de kinase, en faisant macérer de la muqueuse intestinale de chien dans de l'eau chloroformée ou toluolée. M. DASTRE traite la muqueuse par le carbonate de soude à 1,5 ‰, filtre le macéré et précipite par l'acide acétique. Le précipité contient les nucléo-albumines du tissu et entraîne une grande partie de la kinase. En le redissolvant dans une solution faible de carbonate de soude, on a une solution riche en kinase.

Le mélange de *suc pancréatique inactif* et de *solution de kinase* digère activement les protéiques ; nous dirons, sans vouloir rien en préjuger de l'action réciproque de la protrypsine et de la kinase, qu'il renferme de la *trypsine*. C'est avec ce suc kinasé que doivent être conduites toutes les expériences ayant pour but d'étudier les propriétés physico-chimiques de la trypsine et c'est parce que beaucoup d'expériences ont été réalisées avant la découverte de ces perfectionnements techniques qu'on ne sait dans quelle mesure peuvent se raccorder les résultats anciens et nouveaux.

On s'est, en effet, beaucoup servi d'*extraits pancréatiques* préparés avec la glande elle-même et des dissolvants variés. Si ces extraits doivent être abandonnés dans les recherches chimiques et physiologiques sur la trypsine, ils conservent, au point de vue de l'application thérapeutique du ferment, tout leur intérêt.

Ce sont en effet des extraits pancréatiques qui constituent les *pancréatines* pharmaceutiques. Notons tout de suite que ces extraits pancréatiques diffèrent des sucs pancréatiques par deux caractères importants : 1° ils sont directement protéolytiques ce qui s'explique suffisamment par ce fait qu'ils renferment de

la kinase d'origine leucocytaire ; 2° ils renferment, en dehors des ferments normaux du suc pancréatique, d'autres ferments empruntés au tissu de la glande.

Les dissolvants employés pour la préparation des extraits de pancréas sont l'eau, la glycérine hydratée, l'alcool faible.

La méthode officinale qui était inscrite au Codex supplément de 1895) est une des plus simples.

On prend :

Pancréas.....	1 partie.
Eau	2 parties.

Les pancréas, débarrassés des parties étrangères qui les accompagnent, sont divisés et délayés dans l'eau légèrement chloroformée pour empêcher l'altération. Après quelque temps de contact, séparez le résidu insoluble, exprimez et filtrez le liquide obtenu ; recevez le dans des vases à large surface et évaporez le rapidement dans un courant d'air, à une température qui ne doit pas dépasser 45°.

Il est à peine nécessaire de souligner l'imprécision des termes employés par le Codex. Ni l'origine des pancréas, ni le temps de macération, ni la quantité de chloroforme, ni la température d'évaporation ne sont indiqués avec exactitude.

On emploie habituellement des pancréas de porc. Les organes doivent être recueillis chez les animaux en digestion — car c'est à ce moment qu'ils sont le plus actifs — et utilisés dès que possible. On peut fixer la durée de la macération à 6 h. : l'évaporation s'effectue dans les meilleures conditions dans le vide à 0°. M. CHOAY (1) a bien montré la supériorité des extraits opothérapiques préparés par concentration dans le vide à froid et les considérations qu'il a développées s'appliquent parfaitement à la préparation de la pancréatine médicinale.

VON WIRRICHT (1) a préconisé l'emploi de la glycérine comme dissolvant. Il faut employer la glycérine hydratée, non de la glycérine pure qui est un mauvais dissolvant de la trypsine.

Les organes sont lavés à l'eau froide, broyés dans de l'alcool absolu qui rend l'albumine insoluble. Au bout de quelque

(1) CHOAY. — Influence du mode de préparation sur l'activité des extraits opothérapiques. *B. S. P.*, XV, 431, 1908.

temps, on lave le résidu à l'alcool et on le fait digérer dans de la glycérine ; après quelques jours, on filtre et on précipite la solution glycérique par l'alcool. Le précipité est recueilli et traité de nouveau successivement par l'alcool et la glycérine. Le ferment à peu près pur est enfin précipité de cette solution par l'alcool absolu.

KÜHNE (2) a indiqué divers procédés, il a indiqué le suivant en 1876 :

Le pancréas broyé est épuisé par de l'eau à 0°; la solution est précipitée par addition d'alcool et le précipité est mis à digérer pendant quelque temps avec de l'alcool absolu pour rendre l'albumine insoluble. Il est alors repris par l'eau et la solution est additionnée peu à peu d'acide acétique jusqu'à ce qu'elle en renferme 1 %; on filtre, on porte à 40° pendant quelque temps, on filtre de nouveau, on rend le liquide alcalin par du carbonate de soude, et après une nouvelle filtration pour séparer les sels terreux, on évapore à 40° ; il se sépare de la tyrosine et finalement la trypsine est débarrassée par dialyse d'un reste de tyrosine, de la leucine et des peptones qui l'accompagnent.

La méthode ci-dessous est due à LOEW (3).

La glande hachée est abandonnée à elle même 2 jours à 14°, puis mise à digérer pendant 2 autres jours avec une fois et demi son poids d'alcool à 40 %. La masse est alors passée à travers un tamis de soie, le liquide est filtré et précipité par un mélange de 2 volumes d'alcool et 1 volume d'éther. Le précipité recueilli est exprimé et dissous dans l'eau, reprécipité par l'alcool étheré et séché sur l'acide sulfurique. C'est un mélange de ferment et de peptones que l'on sépare en précipitant les dernières par l'acétate basique de plomb d'après la méthode qui a permis à WURTZ de purifier la papaine.

A cet effet, on redissout le précipité dans l'eau, on le précipite exactement par le sous-acétate de plomb, on fait passer de l'hydrogène sulfuré dans le liquide filtré et l'on ajoute un mélange d'alcool et d'éther. Le ferment se précipite et il ne reste plus qu'à le laver à l'alcool absolu et

(1) VON WITTICH. — Ueber eine neue Methode zur Darstellung künstlicher Verdauungsflüssigkeiten. *Pflüg. Archiv.*, II, 198 (1869), III, 339 (1870).

(2) KÜHNE. — Ueber das Verhalten verschiedener organisirter und ungeformter Fermente. *Verhandl. der naturhist. med. Ver., Heidelberg*, 1876, t. I, p. 194, et Vereinfachte Darstellung des Trypsins, *même recueil*, 1884, t. III, p. 463.

(3) LOEW. — Über die chemische Natur der ungeformten Fermente. *Pflüg. Archiv.*, XXVII, 203, 1882.

à le sécher sur l'acide sulfurique. On obtient ainsi 0,2 % du poids du pancréas d'un ferment très soluble dans l'eau, qui offre à la fois les propriétés saccharigène et peptogène. Celles-ci disparaissent à 69-70°. Il présente les réactions des peptones.

Les méthodes précédentes donnent des produits actifs non seulement sur les protéiques mais aussi sur les féculents. Ils renferment donc, entre autre diastases, la trypsine et l'amylase. Certains possèdent, à un degré plus ou moins marqué, la propriété de saponifier les graisses ou plus exactement de saponifier les monoéthers comme la monobutyryne.

La pancréatine des pharmacies est fortement protéolytique et amylolytique. Bien préparée, elle renferme aussi de la monobutyrynase.

On s'est efforcé d'obtenir des extraits pancréatiques ne renfermant qu'un seul de ces trois ferments. On y a réussi très incomplètement. Le ferment saponifiant est assez fragile pour pouvoir être séparé des deux autres, mais il est très difficile de séparer intégralement la trypsine de l'amylase. DANILEWSKI (1), pour les dissocier, a mis à profit l'adhérence du ferment protéolytique au précipité gélatineux que provoque l'addition de collodion à un macéré de pancréas.

PASCHUTIN (2) utilise l'inégale solubilité des divers ferments dans les solutions salines. L'iodure de potassium, le sulfate de potasse, l'arséniate de soude, le sel de Seignette dissoudraient de préférence la trypsine.

M. DASTRE (3) a observé que, dans la macération du pancréas, le ferment qui passe le plus rapidement en solution est le ferment amylolytique. Si par exemple on fait macérer pendant 15 à 20 heures à 40°, dans la solution physiologique de chlorure de sodium, un pancréas coupé en gros fragments, on obtient

(1) DANILEWSKI. — Ueber specifische wirkende Körper des natürlichen und künstlichen pancreatischen Saftes. *Virchow's Archiv.*, XXV, 279, 1862.

(2) PASCHUTIN. — Ueber Trennung der Verdauungsfermente. *Reichert's Archiv für Anatomie und Physiologie*, p. 382, 1873, cité d'ap. *Maly's Jahresb.*, III, 325, 1873.

(3) DASTRE. — Ferments du pancréas : leur indépendance physiologique. *C. R. Soc. Biologie*. XLV. 648, 1893, et *Archives de physiologie*, XXV, 774, 1893.

un macéré à pouvoir amylolytique prédominant ; si, après cette première extraction, les morceaux sont finement divisés et soumis à une nouvelle macération dans la solution saline (additionnée de 1 % de fluorure de sodium pour éviter la putréfaction), on obtient un extrait riche en trypsine et très pauvre en amylase.

M. DASTRE a également observé que le pancréas d'un animal à jeun depuis quelques jours, possède presque exclusivement le pouvoir protéolytique.

SOUS-CHAPITRE II.

Propriétés physico-chimiques de la trypsine, ses conditions d'activité sur les substances protéiques.

Nous ne connaissons la trypsine que par ses propriétés protéolytiques. Nous ne connaissons rien de sa composition.

On a fait l'analyse élémentaire de trypsines préparées par quelques-uns des procédés que nous avons indiqués. Il n'y a aucun intérêt à rapporter ces analyses qui portent sur des mélanges et ne peuvent rien nous apprendre. Quant au suc pancréatique, c'est un liquide incolore, plus ou moins visqueux, alcalin, renfermant en moyenne chez le chien 10 % de matières solides, dont 1/10 de matière minérale. Il présente les réactions colorées des substances protéiques. Mais cette étude ne nous apprendrait rien non plus de la trypsine elle-même.

Tout ce que nous pouvons dire de ses propriétés physiques a trait à sa *solubilité* et à sa *température de destruction*. Elle est soluble dans l'eau, dans la glycérine hydratée, dans l'alcool faible, dans les solutions salines étendues, précipitée au contraire par l'alcool fort et le sulfate de soude à saturation.

Elle est détruite par la chaleur. En solution aqueuse, elle est déjà atteinte par une température de 35° maintenue 24 heures (HEIDENHAIN) (1). Sa température mortelle est 69-70° d'après Lœw (2), 60° d'après HARLAY (3); d'autres chiffres ont été

(1) HEIDENHAIN. — Beitrag. zur Kenntnis des Pancreas. *Pflüg. Arch.*, X, 579, 1875.

(2) LÖEW. — Über die chemische Natur der ungeformten Fermente. *Pflüg. Arch.*, XXVII, 203, 1882.

(3) HARLAY. — *Thèse citée*, pp. 63 et 65.

publiés (VERNON, BIERNACKI) (1). Il est inutile d'insister sur les divergences qu'ils présentent. De légères différences dans la réaction des solutions expérimentées ou la durée d'action de la chaleur les expliquent suffisamment.

Sèche, la trypsine peut supporter, sans atténuation d'activité, une température élevée, plusieurs heures à 100° (HÜFNER (2), SCHMIDT (3), HARLAY. D'après SALKOWSKI (4), elle résiste à la température de 160° prolongée 1 heure 1/2 ; elle est détruite à 170°.

On peut se demander comment se comportent vis-à-vis de la chaleur les deux substances dont le mélange — question d'interprétation à part — constitue la trypsine, c'est-à-dire la *protrypsine pancréatique* et la *kinase entérique*. La kinase du suc intestinal, en milieu neutre ou à peine acide ne s'altère pas sensiblement à l'étuve (40°) et pas du tout à la température ordinaire (DELEZENNE). La kinase obtenue par macération et maintenue à l'étuve en milieu légèrement alcalin (soit une alcalinité égale à celle où la kinase agit physiologiquement), se détruit assez rapidement (DASTRE et STASSANO). De son côté, le suc pancréatique de fistule abandonné à l'étuve s'affaiblit spontanément. Il ne faut pas oublier que ce suc est assez fortement alcalin. Il n'est pas sans intérêt de noter cette autodestruction de diastases placées dans des conditions de température et de réaction qui sont précisément celles où elles se trouvent lorsque s'exerce leur activité.

Cet affaiblissement de la kinase d'une part et de la protrypsine d'autre part est encore aggravé lorsque l'un ou l'autre de ces ferments se trouve placé dans les mêmes conditions, en présence de l'albumine. Enfin le mélange kinase+protrypsine (et ceci

(1) VERNON. — The conditions of action of trypsin on fibrin. *J. of physiology*, XXVI, 405, 1901.

BIERNACKI. — Das Verhalten der Verdauungsenzyme bei Temperaturerhöhung. *Z. f. Biol.*, XXVIII, 49, 1891.

(2) HÜFNER. — Untersuchungen über ungeformte Fermente und ihre Wirkungen. *J. f. prakt. Chem.*, V, 372, 1872.

(3) SCHMIDT. — Bemerkung zu Gauthier's Fibringerinnungsversuche, *Cib. f. d. med. Wissen.*, d'ap. *Maly's Jahresber.*, VI, 273, 1876.

(4) SALKOWSKI. — Verhalten des Pankreasfermentes bei der Erhitzung. *Virchow's Archiv.*, XXV, 158, 1877.

revient à parler de la trypsine elle-même se détruit également à l'étuve, la destruction pouvant être considérée comme le résultat de l'autodestruction de chaque élément, celle-ci un peu modifiée dans sa marche par le rapprochement des deux diastases.

..

L'activité protéolytique de la trypsine est fonction de la température et de la réaction ; elle est modifiée, exaltée ou entravée par la présence de diverses substances minérales ou organiques. Ce sont ces diverses circonstances que nous allons passer en revue.

La température optima d'action est voisine de 40°.

La trypsine agit en milieu alcalin, neutre au tournesol, ou même légèrement acide.

On donne comme optima une réaction alcaline comprise entre 0,2 et 3 % de carbonate de soude, le maximum étant fixé un peu au-dessous de 1 %. Dans les digestions artificielles, on adopte généralement une alcalinité équivalente à 0,5 % de carbonate de soude.

Le suc pancréatique est naturellement alcalin. BAYLISS et STARLING donnent l'alcalinité du suc de sécrétine comme égale à celle d'une solution N/10 de carbonate de soude.

A. DIETZE (1) s'est proposé d'établir quel est le degré d'alcalinité le plus favorable à la digestion trypsique, en comparant à ce point de vue un carbonate alcalin, le carbonate de potassium et les trois bases alcalino-terreuses, baryte, strontiane et chaux.

Dans ce but, il met en route des digestions de fibrine où toutes les conditions sont identiques, sauf les quantités de bases introduites. Au bout d'un temps donné, et le même pour tous les essais, il dose, par la méthode de KJELDAHL, l'azote dissous.

Dans ces conditions il observe que baryte, strontiane et chaux sont sensiblement équivalentes et favorisent au maximum la digestion trypsique lorsque leur concentration va de $\frac{1}{140}$ à $\frac{1}{300}$ de molécule par litre. Mais le carbonate de potassium se com-

(1) A. DIETZE, Einfluss von Baryumoxydhydrat, Calciumoxydhydrat, Strontiumoxydhydrat auf die tryptische Verdauung, *Diss. Leipzig*, 1900.

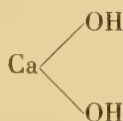
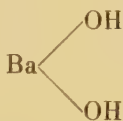
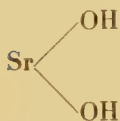
porte autrement ; son optimum d'action se trouve placé entre $\frac{1}{13,8}$ à $\frac{1}{20}$ de molécule-gramme par litre.

KANITZ (1) fournit de ces expériences une autre interprétation.

Les bases terreuses et le carbonate alcalin sont inégalement dissociés dans leurs solutions. D'autre part les éléments qui entrent en jeu et qu'il convient de considérer, ce sont les oxydrides libres.

Or, la chaux, la strontiane, la baryte, aux dilutions auxquelles se manifeste leur maximum d'activité, peuvent être considérées comme entièrement dissociées.

Puisque l'optimum d'action se réalise pour les bases



aux concentrations $\frac{1}{140}$ à $\frac{1}{300}$ de molécule-gramme on peut écrire que cet optimum est égal à la moitié, soit $\frac{1}{70}$ à $\frac{1}{150}$ pour les OH.

Quel est d'autre part l'état du carbonate de potassium dans ses solutions ? Dans une dissolution à $\frac{1}{13,8}$ de molécule-gramme par litre la dissociation n'atteint que 3,61 % du sel.

Par conséquent la concentration active est $\frac{1}{13,8 \times 100} = \frac{1}{183}$ et,

exprimée en ions, $\frac{1}{191}$. DIETZE ayant donné pour les concentrations optima de carbonate de potassium $\frac{1}{13,8}$ à $\frac{1}{20}$ de molécule-gramme, on peut dire que la concentration active en ions est voisine de $\frac{1}{200}$. Et l'on voit que ce chiffre n'est pas trop éloigné du chiffre maximum $\frac{1}{150}$ indiqué pour les bases alcalino-terreuses.

(1) KANITZ. — Ueber den Einfluss der Hydroxylionen auf die tryptische Verdauung. *Z. ph. Ch.*, XXXVII, 75, 1902-03.

On peut donc conclure avec l'auteur que le carbonate de potassium ne se comporte pas autrement que ces bases et que la marche de la digestion trypsique est optima dans une liqueur où la concentration des OH libres est de $\frac{1}{70}$ à $\frac{1}{200}$ N.

Bien que présentant son maximum d'activité en milieu alcalin, la trypsine reste encore active en milieu neutre. Elle supporte même une faible acidité : mais elle n'agit pas si le taux d'acide dépasse 0.05 % d'acide chlorhydrique (KÜHNÉ).

* *

La trypsine a, comme toutes les diastases, ses corps favorisants et ses retardateurs.

Les acides minéraux ou organiques sont tous défavorisants. Les sels halogénés des métaux alcalins sont empêchants, mais peu. L'oxalate de soude l'est davantage, les sulfates alcalins plus encore. Le borate de soude est sans influence et le phosphate disodique est favorisant (H. R. WEISS (1)).

Le chloroforme, le thymol, le toluol n'ont pas d'influence marquée (KAUFMANN) (2).

Les bases organiques, comme la nicotine, la conine, l'atropine accélèrent son action. D'autres, comme la morphine, la vératrine, la retardent.

Le sérum normal des animaux est antitrypsique, propriété annoncée par FERMI (3), vérifiée par un grand nombre d'auteurs (PUGLIESE et COGGI, HAHN, CAMUS et GLEY, LANDSTEINER), mesurée par ACHALME (4) et observée chez les animaux inférieurs (Poissons, Invertébrés) par SELLIER (5).

C'est à une antitrypsine que WEINLAND (6) avait attribué l'im-

(1) H. R. WEISS. — Zur Kenntnis der Trypsinverdauung. *Z. ph. Ch.*, XL, 480, 1904.

(2) KAUFMANN. — Ueber den Einfluss von Protoplasmagiften auf die Trypsinverdauung. *Z. ph. Ch.*, XXXIX, 434, 1904.

(3) FERMI. — D'après *Atb. f. Physiologie*, VIII, 659, 1894.

(4) ACHALME. — Recherches sur les propriétés pathogènes de la trypsine et le pouvoir antitryptique du sérum des cobayes neufs et immunisés. *A. I. P.*, XV, 737, 1901.

(5) SELLIER. — Action antiprotéolytique du sérum sanguin des animaux inférieurs. *C. R. Biologie*, LIV, 628, 1905.

(6) E. WEINLAND. — Ueber Antifermente. *Zeichrift für Biologie*, XLIV, 1 et 45, 1902.

munité particulière dont jouissent les parasites intestinaux (*Ascaris*, etc) vis à vis du ferment protéolytique du pancréas. MM. DASTRE et STASSANO (1) ont établi qu'il s'agit d'un mécanisme un peu différent. L'action anti s'exerce sur la kinase. C'est une *antikinase*. Au même moment, M. DELEZENNE (2) établissait à son tour que l'action antiprotéolytique du sérum sanguin est une action antikinasique.

La production d'antikinase paraît constituer un mode général de défense des organismes et des tissus vis à vis l'action protéolytique de la trypsine ; à ce titre, son intérêt biologique est considérable. Mais ce n'est pas ici le lieu d'insister sur le sujet, et d'exposer les opinions contradictoires qu'il a provoquées.

(1) DASTRE et STASSANO. — Existence d'une antikinase chez les parasites intestinaux. *C. R. Biologie*, LV, 130, 2903.

(2) C. DELEZENNE. — Sur l'action antikinasique du sérum sanguin. *C. R. Biologie*, LV, 132, 1903.

SOUS-CHAPITRE III.

Action de la trypsine sur les substances protéiques.

A. *Marche générale de la digestion trypsique. Schéma de Kühne et Neumeister.*

Soumettons à l'action du suc pancréatique activé, ou à l'action d'une solution artificielle de trypsine, dans les conditions favorables de température et d'alcalinité, une protéine, de la fibrine par exemple ; nous la verrons se désagréger petit à petit, et peu à peu se dissoudre en laissant généralement un faible résidu insoluble.

Les premières phases de la transformation subie par la substance protéique ne sont pas entièrement semblables à celles que j'ai décrites à propos de la digestion pepsique ; on n'assiste pas en particulier au gonflement de la substance qui se produit en milieu acide.

Si tout à fait au début de l'action de la trypsine, on acidule le liquide par l'acide acétique et si on chauffe, il se fait un coagulum que l'on a considéré comme une globuline. Ce serait la première étape dans la transformation de la fibrine (1).

Mais très rapidement la fibrine est plus profondément attaquée et il se fait des albumoses.

Ces albumoses identiques, semble-t-il, aux albumoses pepsiques sont, comme elles, artificiellement subdivisibles en fractions plus ou moins nombreuses.

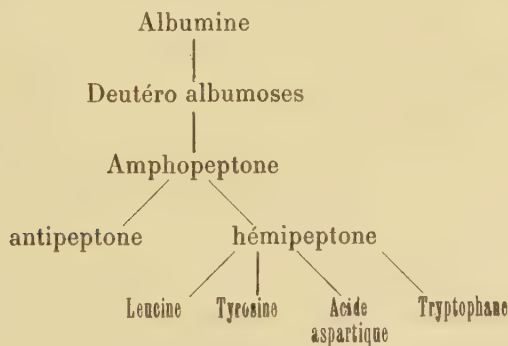
Ces albumoses primaires disparaissent d'ailleurs très vite du milieu où on ne trouve bientôt plus que des deutéroprotéoses puis des peptones.

(1) D'après ARTHUS et HUBER, ce serait de la fibrine dissoute dans ses produits de transformation.

Mais l'action ne s'arrête pas là.

On voit bientôt apparaître dans la liqueur digestive des masses blanchâtres qui, examinées au microscope, se montrent constituées par de nombreuses et fines aiguilles cristallines. Ce sont des cristaux de tyrosine. Si l'on prélève un peu du liquide et qu'on le concentre, on obtient des cristaux de leucine. Enfin si, la digestion prolongée, on soumet le liquide à une analyse méthodique, on trouve une série de corps cristallisables ne possédant plus aucune des propriétés de l'albumine primitive ni des peptones, ce sont des acides aminés et des acides diaminés. Il se fait, selon la pittoresque expression de HUGONENQ, un véritable broyage moléculaire et la trypsine mérite bien le nom que KÜHNE lui a donné (trypsine, de *θρυπτεσθαι*, je disloque).

Pourtant la totalité de la molécule protéique ne se transforme pas en amino-acides. Une portion s'arrête au stade peptone. J'ai eu l'occasion d'expliquer la conception de KÜHNE, de définir l'hémigroupe, l'amphopeptone. Dans la digestion tryptique, l'amphopeptone serait démembrée en *hémipeptone*, corps hypothétique qui se disloquerait en une série d'acides et en *anti-peptone*, corps présentant les réactions générales des peptones, entre autres, celle du biuret, et qui résisterait à la trypsine. C'est la théorie classique. Je la résume en un schéma que j'emprunte à NEUMEISTER (1).



(2) NEUMEISTER.— Lehrbuch der phys. Chemie, Iéna, 1897.

La trypsine serait donc un ferment soluble qui en milieu neutre ou alcalin transforme les substances protéiques, d'abord en albumoses et peptones, puis aboutit à la formation d'acides aminés et d'un résidu inattaquable d'antipeptone.

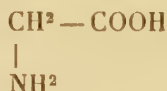
Mais il nous faut examiner d'un peu plus près : 1° *quels sont les acides aminés résultant de la digestion trypsique*, et 2° *ce qu'est devenue la notion de l'antipeptone de КÜHNE*.

B. Acides aminés, oxyaminés, diaminés, etc., produits par hydrolyse trypsique des substances protéiques.

Presque tous ces corps sont à chaîne linéaire ; quelques-uns se rattachent à la série cyclique ; ils présentent une ou plusieurs fonctions acide, amine, alcool, phénol. Ils sont ici groupés d'après la nature de leur chaîne et de leur fonction. Il ne saurait être question de faire l'histoire chimique de chacun d'eux, mais je fais suivre leur nom et leur formule de l'indication des constantes physiques ou des propriétés chimiques qui peuvent être utilisées pour leur isolement et leur caractérisation.

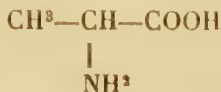
Acides monoaminés monobasiques.

Glycocolle (acide aminoacétique, aminoéthanoïque, glycine).

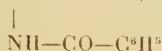


Son éther éthylique bout à 51°5-52°5 sous 10 millimètres de pression. Le chlorhydrate de cet éther $\text{HCl-NH}^2\text{-CH}^3\text{-CO-O-C}^2\text{H}^5$ se produit quand on fait passer jusqu'à saturation de l'acide chlorhydrique gazeux et sec dans la solution de glycocolle dans l'alcool absolu et cristallise par refroidissement en aiguilles, fondant à 144° (145° corr.).

Alanine d (acide α aminopropionique d).

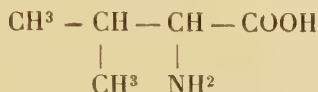


Son éther éthylique bout à 48°,5 sous 10 millimètres de pression. Son dérivé benzoylé $\text{CH}^5 - \text{CH} - \text{COOH}$, fond à 165°.



L'alanine elle-même fond vers 195° en s'altérant. L'alanine naturelle est l'isomère droit $[\alpha_D]^{20} = + 10^{\circ},3$.

Acide α aminoisovalérianique d.

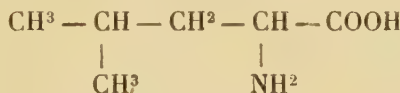


Son éther éthylique passe à la distillation fractionnée sous 10 millimètres de pression vers 80°.

Le pouvoir rotatoire de cet acide en solution chlorhydrique est $[\alpha_D]^{20} = + 27,1$. Il donne avec l'éther phénylisocyanique une uréide que, suivant une réaction générale, l'acide chlorhydrique transforme en isopropyl phénylhydantoïne $(\text{CH}^3)_2\text{C} = \text{CH} - \text{CH} - \text{CO}$ fondant à 117°.



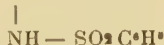
Leucine l (acide α aminoisocaproïque gauche).



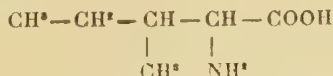
Son éther éthylique passe à la distillation fractionnée sous 10 millimètres, entre 70 et 90°. Régénérée de son éther, elle cristallise facilement. P. f. 170°. Lévogyre en solution aqueuse, dextrogyre en sol. chlorhydrique. $(\alpha_D = + 17^{\circ})$.

Son dérivé benzoylé fond à 105-107°.

Son dérivé benzolsulfoné $(\text{CH}^3)_2\text{CH} - \text{CH}^2 - \text{CH} - \text{COOH}$ fond à 119-120°.

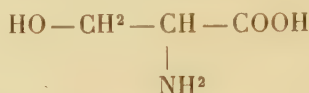


Elle est souvent mélangée et difficilement séparable d'une isoleucine, dont la formule probable est :



Acide oxyaminé monobasique.

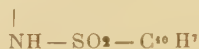
Sérine (acide α amino- β oxy-propionique).



Son éther éthylique, sous 10 millimètres, passe entre 100 et 130°.

La sérine fond vers 246° en s'altérant.

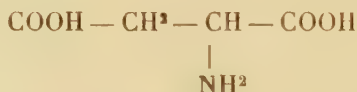
Son dérivé naphtylsulfoné $\text{HO} - \text{CH}^2 - \text{CH} - \text{COOH}$



est peu soluble dans l'eau et dans l'alcool. Il fond vers 210°.

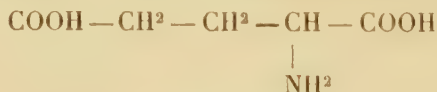
Acides monoaminés bibasiques.

Acide aspartique l (acide α aminosuccinique gauche).

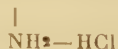


Son éther éthylique passe à la fin de la distillation du mélange des éthers d'acides aminés. Son sel de Ba et son sel de Cu sont peu solubles. Sa saveur fortement acide le distingue de l'acide glutamique.

Acide glutamique d (acide α aminoglutarique d).



Le chlorhydrate de cet acide, $\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CH} - \text{COOH}$

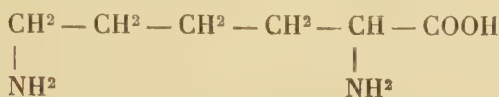


est peu soluble.

L'acide glutamique a une saveur fade particulière et peu acide.

Acides diaminés monobasiques.

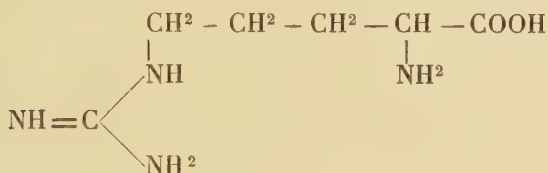
Lysine d (acide α - ϵ diaminocaproïque d).



L'acide phosphotungstique la précipite. L'azotate d'argent, l'eau de baryte ne la précipitent pas. Le sel de baryum de son dérivé benzoylé est peu soluble.

Le chlorhydrate, le picrate, le chloroplatinate ont des formes cristallines caractéristiques.

Arginine d (acide α -amino δ -guanéido-valérianique normal d).



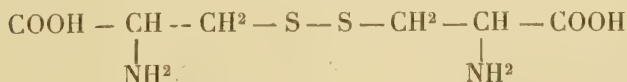
Base très fortement alcaline; l'acide phosphotungstique la précipite. Elle donne avec divers sels (azotate d'argent, azotate de cuivre) des combinaisons peu solubles.

Le chlorure mercurique précipite l'arginine libre, et le précipité est soluble dans l'anhydride carbonique.

En ajoutant une solution alcoolique d'acide picrique à une solution d'arginine il se fait un précipité jaune doré, soyeux, de picrate d'arginine.

Acide diaminé bi-basique sulfuré.

Cystine l (acide diamino- β -dithiopropionique).



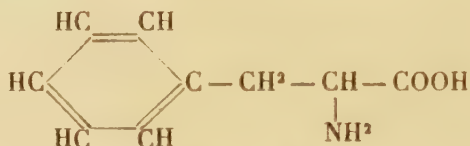
Chauffée avec une solution sodique d'oxyde de plomb, elle donne un précipité noir de sulfure de plomb.

Son dérivé benzoylé est insoluble et fond à 180-181°.

Corps présentant une chaîne fermée.

1° Benzénique.

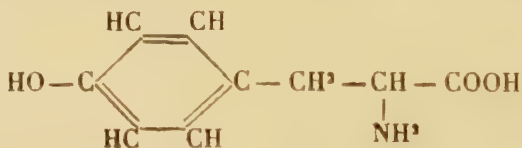
Phénylaanine l. (ac. phénylaminopropionique).



Son éther éthylique passe à la distillation sous 0,5 de pression au-dessus de 100°. Ce corps est très soluble dans l'éther ordinaire. Par oxydation chromique, la phénylaanine donne de la phénylacétaldéhyde d'odeur caractéristique.

Sa combinaison phénylisocyanique fond à 180-181°.

Tyrosine l. (acide paro-oxy-β-phényl-α-amino-propionique ; para-oxy-phénylalanine).

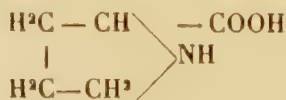


Elle est très peu soluble dans l'eau ; elle se sépare spontanément à l'état cristallisé, souillée de leucine dont on la sépare en mettant à profit son insolubilité dans l'acide acétique cristallisable et l'alcool.

Le réactif de Millon ajouté en petite quantité à une solution de tyrosine précipite des flocons rouges et la liqueur se colore en rose intense. La tyrosinase l'oxyde en donnant une coloration rouge puis noire (Voir plus loin).

2° Pyrrolidique.

Proline l. (acide pyrrolidine α carbonique l.).



Son éther éthylique bout à 75-76° sous 11^{mm} de pression.

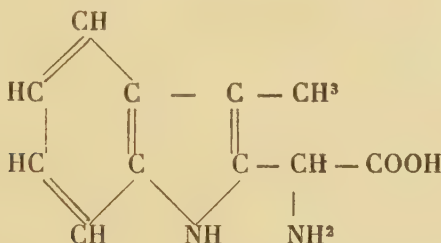
La phénylhydantoïne qui en dérive fond à 144°.

Son dérivé β naphtalène sulfoné fond à 138°.

Son sel de cuivre est très peu soluble et cristallise en lamelles bleues et brillantes.

3° Indolique.

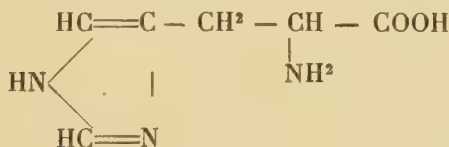
Tryptophane (acide scatolaminoacétique).



Ce corps donne par addition d'eau de chlore ou d'eau de brome une coloration rouge (V. plus loin).

4° Imidazolique.

Histidine (acide α amino- β -imidazolpropionique).



L'acide phosphotungstique la précipite ; le chlorure mercurique la précipite même en présence de CO^2 .

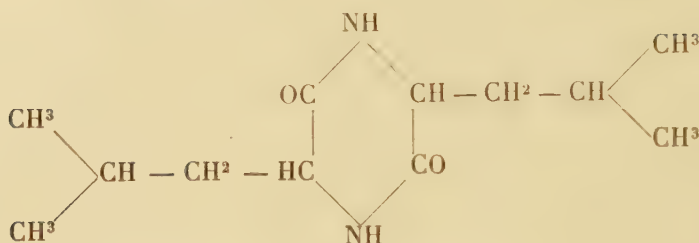
Une solution acide d'histidine, additionnée de nitrate d'argent, donne, par l'eau de baryte, un précipité d'histidine argentique.

L'histidine en solution nitrique est précipitée par additions alternatives de nitrate d'argent et d'ammoniaque.

Lévogyre à l'état libre ; ses sels sont dextrogyres.

5° *Pipérazinique.*

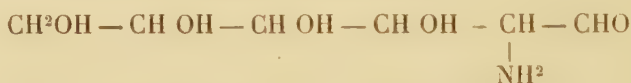
Leucinimide ($\beta\delta$ di-isobutyl- $\alpha\gamma$ -diacipipérazine).



C'est en réalité la dicétopipérazine dérivée de la leucine.

A cette liste il faut ajouter :

la **glucosamine**, aldéhyde-alcool-amine ;



et l'**ammoniaque**, NH^3 .

Quant à la putrescine (tétraméthylène-diamine), la cadavérine (pentaméthylène-diamine), l'oxyphényl éthylamine, l'ornithine (acide $\alpha\delta$ diaminovalérianique) dont les relations avec l'acide valérianique, la tyrosine et l'arginine sont faciles à saisir, et qu'on a parfois données comme produits de digestion *trypsique*, il paraît certain que telle n'est pas leur origine. Il y a lieu de faire ici des réserves analogues à celles que j'ai faites à propos de la production de ces mêmes corps dans la digestion peptique.

Il serait assurément très désirable de pouvoir donner ici une marche systématique pour l'analyse méthodique et complète du mélange provenant de la digestion trypsique d'une substance protéique quelconque.

C'est ce que la littérature chimique ne permet pas encore de faire d'une façon satisfaisante.

Il est clair que les méthodes appliquées dans ces dernières années à l'étude des produits de l'hydrolyse acide des substances protéiques, s'appliquent à celles des produits de l'hydrolyse diastasique.

On s'inspirera, entre autres, de la méthode de séparation des acides monoaminés, par distillation fractionnée sous pression très réduite de leurs éthers éthyliques, donnée par M. E. FISCHER, des méthodes appliquées par ce savant et E. ABDERHALDEN pour séparer les acides aminés des polypeptides, des méthodes de séparation des bases hexoniques dues à DRECHSEL, SCHULZE, HEDIN et surtout KOSSEL. Ce serait sortir du cadre de ce mémoire que d'entrer sur ce sujet dans des détails nécessairement longs (1).

*
* *

L'énumération des corps caractérisés parmi les produits de la digestion trypsique des albumines appelle un certain nombre d'observations.

a) *Comparaison entre les produits de l'hydrolyse trypsique et de l'hydrolyse acide.*

C'est d'abord la presque identité de cette liste et de celle des produits de l'hydrolyse acide des substances protéiques.

Il n'est guère que l'acide trioxydiaminododécylique qui, signalé par E. FISCHER et E. ABDERHALDEN dans la décomposition de la caséine par les acides, n'ait pas été, à ma connaissance du moins, indiqué comme produit de l'hydrolyse diastasique.

Une différence importante entre les deux méthodes d'hydrolyse, c'est que l'une, l'hydrolyse par le ferment, fournit des corps doués d'activité optique (sauf le glycocolle qui ne saurait posséder le pouvoir rotatoire), tandis que l'autre, l'hydrolyse par les acides, fournit des corps plus ou moins racémisés.

(1) On trouvera dans la récente publication d'E. ABDERHALDEN les détails techniques et les indications bibliographiques. E. ABDERHALDEN. *Neuere Ergebnisse auf dem Gebiete der speziellen Eiweisschemie*. G. FISCHER. Iéna, 1909.

b) *Réactions colorées de la tyrosine et du tryptophane ; distinction entre les digestions pepsique et trypsique.*

La digestion trypsique libère un certain nombre de corps, faciles à caractériser par des réactions colorées, c'est le cas de la tyrosine et du tryptophane.

Dans le cas de la digestion pepsique, *au moins lorsque celle-ci n'est pas longtemps prolongée*, on ne les rencontre pas. On saisit de suite qu'il y a là une méthode pratique pour distinguer rapidement une digestion trypsique d'une digestion pepsique.

Quels sont les réactifs à employer ?

Le meilleur réactif de la tyrosine est un réactif biologique, la *tyrosinase*. Ce ferment soluble oxydant a été découvert par M. G. BERTRAND (1) ; il entre en jeu dans un très grand nombre de processus biologiques d'oxydation. Tout ce que nous avons besoin de savoir ici sur son compte, c'est qu'il oxyde la tyrosine en donnant une coloration rouge qui vire progressivement au noir, puis un précipité noir de mélanine. Bien que cette réaction ne soit pas rigoureusement spécifique, elle peut être, dans le cas actuel, très utilement appliquée à la recherche de la tyrosine et par suite à la caractérisation d'une digestion trypsique.

C'est ce qu'a montré M. V. HARLAY (2). M. HARLAY utilise comme source de tyrosinase, un champignon, *Russula delica* Fr., très riche en cette oxydase, donnant une macération qui ne se colore pas spontanément à l'air et dont l'emploi, sous forme de macération glycérinée, avait été préconisé par M. BOURQUELOT (3). Il serait également avantageux d'employer

(1) E. BOURQUELOT. — Influence de la réaction du milieu sur l'activité du ferment oxydant des Champignons. — Sur la durée de l'activité des ferments oxydants des Champignons en solution dans la glycérine. *C. R. Biologie*, III, 815, 1896 et IV, 454, 1897.

(2) G. BERTRAND. — Sur une nouvelle oxydase ou ferment soluble oxydant, d'origine végétale. *Bull. Soc. Chim.* [3^e S.], XV, 791 (1896) et *C. R.*, CXXII, 1215 (1896).

(3) V. HARLAY. — De l'application de la tyrosinase à l'étude des ferments protéolytiques. *Thèse Doct. Pharm.*, Paris 1900.

une solution de la tyrosinase du son de froment récemment découverte par MM. G. BERTRAND et W. MUTERMILCH (2). Ajoute-t-on une petite quantité de solution de tyrosinase à un liquide de digestion trypsique neutralisé on voit se faire à la partie supérieure du liquide en contact avec l'air une coloration rouge qui envahit le reste du liquide et vire lentement au brun noir. Ajoute-t-on le même réactif à un liquide de digestion pepsique neutralisé, il se produit une teinte rouge passant au bout de quelques heures, au vert olive. Cette couleur qui vire au rouge par l'ammoniaque et redevient verte par l'acide chlorhydrique est produite par oxydation d'un chromogène, désigné par M. HARLAY, sous le nom de vert pepsique.

Ce chromogène, encore inconnu, est très vraisemblablement un peptide à tyrosine du type de ceux qui ont été étudiés, au point de vue de l'action de la tyrosinase, par MM. CHODAT et STAUB (3).

Voici maintenant une réaction différentielle due à la formation de tryptophane dans la digestion trypsique.

« Quelques gouttes d'eau de brome saturée déterminent dans les liquides de digestion pancréatique d'albumine, de fibrine, de caséine, de cong lutine, la formation d'un précipité jaune-rougeâtre, qui se redissout par agitation avec teinte rose violacée. 5 ^{cc} du liquide obtenu dans l'essai de la pancréatine par la fibrine sont déjà nettement colorés en rose par 5 gouttes d'eau de brome. Vingt à trente gouttes donnent une couleur rouge violacé intense ; au delà de trente-cinq gouttes, la couleur devient plus sale et le liquide se trouble ; au delà de 60 gouttes, il se forme un précipité brun violacé nageant dans un liquide jaune. . .

Avec les digestions pepsiques, pas de coloration rouge, que le liquide soit acide ou qu'il ait été neutralisé au préalable. Dans le premier cas l'eau de brome ne colore même pas la liqueur en

(1) G. BERTRAND et W. MUTERMILCH. — Sur la tyrosinase du son de froment. *B. S. P.*, XIV, 437, 1907.

(2) R. CHODAT et W. STAUB. — La spécificité de la tyrosinase et son action sur les produits de la dégradation des corps protéiques. *Archives des Sc. phys. et nat.*, XXIV, 192, 1907.

jaune, à moins qu'on en mette un grand excès : il se fait alors un précipité jaunâtre qui ne change pas de couleur à la longue. Dans le second cas, l'eau de brome détermine un léger trouble, avec très faible et très peu nette coloration brunâtre sale : un excès de réactif donne un précipité jaunâtre » (1).

*
* *

c) *Rapidité d'apparition et ordre de succession des acides aminés.*

Les réactions colorées de la tyrosine et du tryptophane constituent des indices d'autant meilleurs de la nature trypsique d'une digestion que ces corps se forment dès le début de la protéolyse. Les différents amino-acides dont l'union constitue la molécule protéique sont en effet libérés avec une très inégale rapidité. C'est là une notion importante qui doit nous arrêter.

Si, soumettant une matière protéique à l'action de la trypsine, on fait à divers intervalles des prélèvements du mélange en digestion, on peut par l'analyse de chacune de ces prises d'essai apprécier la rapidité avec laquelle se libèrent les divers acides aminés et déterminer l'ordre dans lequel ils apparaissent.

Dans cette voie, ABDERHALDEN a fait, en collaboration avec REINHOLD (2) d'abord, puis avec VÖEGLIN (3), d'intéressantes observations.

Voici, pour fixer les idées, l'une de leurs expériences brièvement rapportée.

Dans cinq grands matras, on fait digérer par du suc pancréatique kinase, des quantités égales d'édestine de graines de cotonnier.

(1) V. HARLAY. — *Loc. cit.*, p. 80-81.

(2) E. ABDERHALDEN et Bela REINHOLD. — Die Monoaminosäuren des Edestins aus Sonnenblumensamen und dessen Verhalten gegen Pankreassaft, *Z. ph. Ch.*, XLVI, 284, 1905 et Der abbau des Edestins aus Baumwollensamen durch Pankreassaft, XLVI, 159, 1905.

(3) E. ABDERHALDEN et Carl VÖEGLIN. — Studien über den Abbau des Caseins durch Pankreassaft. *Z. ph. Ch.*, LIII, 315, 1907.

On analyse les liquides digestifs après 1, 2, 4, 8, 16 jours d'étuve. On chauffe pour détruire le ferment et coaguler les substances coagulables. On dialyse la liqueur filtrée ; dans le dialysat, on détermine : le taux des substances précipitables et non précipitables par l'acide phosphotungstique ; parmi ces dernières on dose la tyrosine que son peu de solubilité permet d'obtenir par simple concentration, l'acide glutamique que l'on précipite à l'état de chlorhydrate peu soluble si on refroidit à 0°, et les autres acides aminés sont recherchés après éthérification suivant la méthode générale d'E. FISCHER.

Or voici ce que l'on observe : dès le premier jour, sur 100 parties de tyrosine que donnerait l'édestine par hydrolyse acide, 78 p. 4 sont déjà libérées ; au deuxième jour c'est la presque totalité 97 p. 6, alors qu'il y a encore dans le liquide digestif une proportion notable de substances coagulables. (au premier jour, plus de $\frac{2}{10}$ et, au deuxième jour, environ $\frac{1}{10}$ du poids de la substance protéique mise en expérience).

L'acide glutamique apparaît lui aussi très vite, dès le premier jour, mais sa proportion augmente moins rapidement : 4,3 % le premier jour, 7,4 % le deuxième, 10,9 % le quatrième, 31,1 % le huitième, 60,2 % le seizième.

Le tryptophane est également parmi les premiers corps libérés.

La leucine, l'alanine, l'acide aspartique apparaissent progressivement ; l'acide valérianique, la sérine n'ont pas été très nettement caractérisés. Peut-être se forme-t-il des traces de phénylalanine ; quant au glycocolle et à l' α proline on ne les trouve pas parmi les corps non précipitables par l'acide phosphotungstique. On voit que les amino-acides apparaissent très inégalement vite dans la protéolyse trypsique : les uns, la tyrosine en tête, sont libérés dès le début et très vite, les autres ultérieurement et plus lentement, d'autres enfin sont encore engagés après 16 jours de digestion sous forme de complexes que l'acide phosphotungstique précipite.

La formation de tyrosine et de tryptophane n'est donc pas, comme on pourrait le penser, la preuve d'une digestion très avancée puisque ces deux corps apparaissent dès le début du

processus digestif, et le rôle du ferment paraît être moins de réduire la molécule protéique en fragment également petits, mais en fragments également assimilables, c'est-à-dire en fragments tels que l'organisme les puisse utiliser pour la construction de ses propres albumines.

Les expériences de BROWN et MILLAR (1) ne font que corroborer celles de leurs devanciers.

Au moyen d'une méthode particulière de dosage de la tyrosine, méthode qu'il n'y a pas lieu de développer ici, ils observent que la trypsine apparaît dès le début de la digestion trypsique ; elle n'apparaît pas au contraire dans la digestion pepsique ; *cette libération extrêmement rapide du noyau tyrosinique par la trypsine* constitue d'après eux, le caractère fondamental de cette diastase, et suffit à la distinguer nettement de la pepsine.

..

C. *Antipeptones, d'après Kühne, d'après Siegfried.*
Polypeptides, d'après E. Fischer.

Dans la digestion trypsique, toute la molécule protéique n'est pas transformée en produits de structure relativement simples, comme les amino-acides que nous venons d'examiner. On se rappelle que, d'après KÜHNE, il subsiste, dans le liquide digestif, une substance inattaquable par la trypsine, donnant encore la réaction du biuret, non précipitable par le sulfate d'ammoniaque. Ce triple caractère définit l'*antipeptone*.

La méthode de préparation de KÜHNE se résumait en ceci : On soumet la substance protéique à une digestion trypsique prolongée ; on concentre le liquide de digestion ; on sépare la tyrosine précipitée par filtration ; on sature le liquide de sulfate d'ammoniaque en milieu neutre, puis acide, puis alcalin ; on précipite ainsi toutes les albumoses ; on les sépare après repos.

(1) BROWN et MILLAR. — The liberation of tyrosine during tryptic proteolysis. *Journ Chem. Soc.*, LXXXIX, 145, 1906.

On précipite la peptone par l'acide phosphotungstique. On décompose le phosphotungstate par la baryte ; on élimine l'excès de baryte par l'acide sulfurique ; on filtre ; on précipite la peptone par l'alcool fort.

Qu'est-ce que l'antipeptone ? Pour KUTSCHER (1), ce n'est pas un corps défini, c'est un mélange. Il en peut retirer des bases hexoniques (histidine, arginine, lysine), et des acides aminés (leucine, acide glutamique, acide aspartique). Mais, d'après SIEGFRIED (2), l'antipeptone préparée par KUTSCHER est très impure, c'est également l'opinion exprimée par BALKE (3). Ayant constaté que l'acide carnique qu'il avait retiré de la carniferrine présente des propriétés analogues à celles de l'antipeptone de KÜHNE, SIEGFRIED essaie d'identifier les 2 produits et il est ainsi conduit à préparer une antipeptone aussi pure que possible. C'est à l'occasion de ces recherches qu'il emploie pour la première fois la méthode de précipitation par l'alun de fer et d'ammoniaque dont nous avons déjà vu diverses applications. Cette méthode le conduit à isoler non pas *une* antipeptone, mais *deux*.

Je résume aussi brièvement que possible la technique que SIEGFRIED (4), puis ses élèves FR. MÜLLER (5) et E. HITSCHMANN (6) ont appliquée à la préparation des antipeptones.

On fait digérer de la fibrine par de la trypsine pendant un temps assez long pour que le liquide ne renferme plus que peu d'albumoses (2 à 8 semaines). On sépare ces albumoses par la méthode connue (sulfate d'ammoniaque à saturation en milieu neutre, acide, alcalin). On acidifie par l'acide sulfurique, on ajoute en agitant une solution d'alun ferro-ammoniacal saturée de sulfate d'ammoniaque tant qu'il se fait un précipité (éviter un excès).

(1) KUTSCHER. — *Über das Antipepton*. *Z. ph. Ch.*, XXV, 195, XXVI, 110 (1898), XXVIII, 88 (1899) et *die Endprodukte der Trypsinverdauung*. *Diss. Strasbourg*, 1899.

(2) SIEGFRIED. — *Ueber Antipepton*. *Z. ph. Ch.*, XXVII, 335, 1899.

(3) P. BALKE. — *Zur Kenntniss der Spaltungsprodukte des Carniferrins*. *Z. ph. Ch.*, XXII, 248, 1896.

(4) SIEGFRIED. — *Ueber Antipepton*, *loc. cit.* et *Ber. Chem. Ges.*, XXIII, 2851, 1900 et, même titre, *Z. ph. Ch.*, XXXV, 164, 1902.

(5) FRITZ MÜLLER. — *Beitrag zur Kenntnis der Antipeptone*. *Z. ph. Ch.*, XXXVIII, 265, 1903.

(6) E. HITSCHMANN. — *Zur Kenntnis der Trypsin-fibrin-peptone*. *Inaug. Diss.*, Leipzig, 1907.

Ce précipité A est recueilli sur un filtre plat, lavé au sulfate d'ammoniaque mis en suspension dans l'eau, décomposé par l'ammoniaque. La solution de peptone est à nouveau traitée comme précédemment (précipitation au sulfate d'ammoniaque, pour éliminer toute trace d'albumose, précipitation à l'alun de fer, séparation du fer par l'ammoniaque, puis on sépare l'acide sulfurique par la baryte et l'excès de baryte par le carbonate d'ammoniaque.

La solution de peptone est évaporée dans le vide à sec; le résidu est repris par un peu d'eau acidulée par l'acide acétique et d'alcool et le tout est versé dans un volume de 90 à 100 fois plus grand d'alcool absolu.

La peptone se précipite sous forme d'un corps blanc floconneux. On recueille, lave à l'alcool, à l'éther et sèche dans l'essiccateur à acide sulfurique. Le produit obtenu est la peptone β .

La liqueur d'où elle a été séparée est additionnée d'alun de fer finement pulvérisé et amenée par l'ammoniaque à une réaction à peine acide. On obtient un deuxième précipité qui est recueilli, mis en suspension dans une solution saturée de sulfate d'ammoniaque et dissous dans de l'acide sulfurique concentré. On reprecipite par l'ammoniaque ajoutée jusqu'à ce que la réaction ne soit plus que faiblement acide. On retire finalement la deuxième peptone, peptone α , par la même technique que la première.

Les antipteptones α et β sont des poudres blanches, non déliquescentes, mais très solubles dans l'eau à laquelle elles communiquent une réaction acide. Elles sont difficilement solubles dans l'alcool à 96° et insolubles dans l'alcool absolu. Leur saveur est acidule, mais non désagréable ni amère.

Elles dévient à gauche la lumière polarisée. Leur pouvoir rotatoire est :

antipteptone β	antipteptone α
$[\alpha_D] = -32,4$ (Müller)	$-24,5$ (Müller)

Elles ne précipitent ni par le ferrocyanure acétique, ni par le sous-acétate de plomb, ni par l'acide métaphosphorique. Elles précipitent au contraire par le tannin, le sublimé, l'acide phosphotungstique et l'acide picrique en excès.

Elles ne donnent ni la réaction de MILLON, ni celle de MOLISCH. Elles donnent au contraire la réaction xanthoprotéique, faiblement celle d'ADAMKIEVICZ, fortement celle du biuret.

Leur analyse élémentaire et la détermination de leur poids moléculaire leur assignent les formules suivantes :

antipteptone β	antipteptone α
$C^{44}H^{49}N^3O^5$ (Siegfried)	$C^{40}H^{47}N^3O^5$ (Siegfried)

Les deux anti-peptones se comportent comme des acides bibasiques et des bases monoacides (NEUMANN). On a surtout étudié leurs sels de baryum, de zinc, d'argent, de cuivre.

Comme les amino-acides qui, en présence d'une base alcalino-terreuse, sont transformés par l'anhydride carbonique en acides carbaminés (SIEGFRIED), elles fournissent des pepto-carbaminates (HITSCHMANN).

Hydrolysées par l'acide chlorhydrique et le chlorure d'étain, ou par l'acide sulfurique à 33 ⁰/₀, elles donnent :

<i>Anti-peptone</i> α :	de l'arginine.....	(SIEGFRIED, MÜLLER).
	de la lysine.....	— —
	de l'acide glutamique.....	— —
	de l'alanine.....	(HITSCHMANN).
	de la proline.....	—
	de l'acide amino-butyrique.....	—

Anti-peptone β : l'arginine, la lysine, l'alanine ont été caractérisées.

On n'a trouvé dans les produits d'hydrolyse ni glyco-colle, ni histidine.

SIEGFRIED considère les « fibrin — trypsin — peptones » étudiées par lui-même et ses élèves comme des individus chimiques bien définis et purs.

KÜHNE admettait l'existence d'un *seul* groupe anti dans la molécule des protéiques. Cette notion doit, d'après M. SIEGFRIED, être modifiée : en présence de trypsine, l'albumine se décomposerait en un complexe rapidement dédoublable en acides aminés et bases, et *deux peptones ne contenant plus le groupe tyrosine, ne renfermant ni soufre, ni groupement hydrocarboné, et résistant à l'action du ferment soluble.*

Ce dernier caractère serait d'ailleurs assez contingent s'il est vrai, comme l'avait avancé MOROCHOWETZ (1), et comme l'admettent beaucoup d'auteurs, MALFATTI (2), LAWROW (3),

(1) MOROCHOWETZ. — Verdauungsgesetze, *St-Péterb. med. Wochenschr.*, 1886, n° 15, d'ap. *Maly's Jahresbericht*, 271, 1886.

(2) MALFATTI. — Beiträg. zur Kenntniss der peptischen Verdauung, *Z. ph. Ch.*, XXXI, 43, 1900.

(3) LAWROW. — Zur Kenntniss des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe, *Z. ph. Ch.*, XXVI, 513, 1898.

KUTSCHER (1), EMERSON (2), etc., et SIEGFRIED (3) lui-même, qu'on puisse en prolongeant l'action de la trypsine, voir disparaître totalement du milieu tout corps biurétique. Dans ces conditions, la conception d'une antipectone tryptique, donnant la réaction du biuret, inattaquable par le ferment tombe entièrement; il n'y aurait pas d'antipectone au sens de KÜHNE (LANGSTEIN) (4) et les antipectones, comme celles de SIEGFRIED, ne seraient que des termes transitoires de la protéolyse.

On a préparé des antipectones, répondant aux caractères que leur assigne SIEGFRIED à partir de corps autres que la fibrine. KRÜGER (5) a étudié une antipectone β de la gélatine (Formule $C^{19}H^{30}N^6O^9$, pouv. rotatoire $[\alpha_D]^{20} = -100.8$ et HAYASHI (6) une antipectone de l'artoline.

Un rapprochement s'impose entre ces antipectones et une série de corps que SIEGFRIED (7), obtient dans l'hydrolyse acide ménagée des diverses substances protéiques et qu'il désigne sous le nom général de *Kyrines*. Lorsqu'on traite la gélatine, la caséine, l'oxyhémoglobine, la fibrine, l'édectine par de l'acide chlorhydrique à 12-16 %, à une température de 37-39° pendant plusieurs semaines, on peut retirer des produits de cette hydrolyse modérée des corps présentant par certains côtés des relations avec les peptones, mais ce ne sont pas, comme on l'a écrit, des peptones cristallisées. Ils s'en éloignent, en effet, par des caractères différentiels importants. Ce sont des corps

(1) KUTSCHER. — Die Endprodukte der Trypsinverdauung. Inaug. Diss. Strasburg, 1899.

(2) EMERSON. — Ueber das Auftreten von Oxyphenyläthylamin bei Pankreasverdauung und über fermentative CO^2 -Abspaltung, Hofm. Beitr., I, 501, 1901.

(3) SIEGFRIED. — Ueber Antipecton und Amphopeptone. Ber. Chem. Ges., XXXIII, 3567, 1901.

(4) LANGSTEIN. — Pepton, Bioch. Centr., IV, 97, 1903.

(5) KRÜGER. — Zur Kenntniss der tryptischen Verdauung des Leims., Z. ph. Ch., XXXVIII, 370, 1903.

(6) HAYASHI. — Über die peptischen Spaltungsprodukte des Weizen Klebereiweisses Artolin, Arch. f. exper. Path. u. Pharm., LII, 289, 1905.

(7) Voir: SIEGFRIED, Ber. d. k. sächs. Ges. d. Wiss., Leipzig, 63 (1903), Z. ph. Ch., XLIII, 44, 46 (1904), XLVIII, 54 (1906), L, 163 (1906), et aussi O. PILZ, Diss. Leipzig (1906); H. KIRBACH, Z. ph. Ch., L, 129 (1906); H. GEIDE, Diss. Leipzig (1907).

basiques, donnant des *phosphotungstates cristallisés*, ne possédant pas le pouvoir rotatoire, bien que leurs produits de décomposition soient actifs, donnant une réaction du biuret un peu modifiée (coloration rouge bordeaux, non violette comme les peptones). Par décomposition, les kyrines fournissent :

Kyrine α de la gélatine.....	arginine, lysine, acide glutamique, glycocolle.
Kyrine β de la gélatine.....	arginine, lysine, acide glutamique.
Kyrine de la caséine.....	arginine, lysine, acide glutamique.
Kyrine de l'hémoglobine.....	arginine, lysine, acide glutamique, histidine.

SIEGFRIED a établi, par des expériences dont le détail ne saurait trouver place ici (constance de composition des sulfates, des carbaminates, etc.), que les kyrines sont des espèces chimiques définies, et non, comme l'avaient prétendu SKRAUP et ZWERGER (1), des mélanges de bases hoxoniques et d'acides.

On ne saurait pour l'instant préciser les relations existant entre ces kyrines et les peptones que nous avons étudiées. Mais ce qui ne paraît pas douteux, c'est, d'une part, l'analogie entre les kyrines et les protamines, d'autre part, l'analogie entre les peptones et les polypeptides artificiels de M. E. FISCHER.

Le développement du premier point n'a pas à prendre place ici ; le second mérite au contraire de nous arrêter.

Les polypeptides synthétiques, ceux qui résultent de la soudure d'un grand nombre de molécules d'acides aminés, ceux surtout qui renferment de la tyrosine, présentent dans l'ensemble de leurs propriétés, des caractères les rapprochant, comme nous l'avons vu, des peptones. Et ce qui donne ici un intérêt particulier à cette remarque, c'est qu'on a précisément isolé des produits de la digestion trypsique des protéiques, des corps possédant les caractères généraux des polypeptides. Le premier

(8) SKRAUP et ZWERGER. — Ueber Kyrine. *Mon. f. Ch.*, XXVI. 1403, 1905.

exemple a été donné par MM. E. FISCHER et E. ABDERHALDEN (1). D'une digestion pancréatique de caséine, ayant dure sept mois, ils retirent par précipitation, au moyen de l'acide phosphotungstique, un corps donnant par hydrolyse chlorhydrique : de la leucine, de l'alanine, des acides glutamique et aspartique, de l'acide α pyrrolidine carbonique, de la phénylalanine. Ce corps bleuit le tournesol rouge : pourtant par des précipitations alcooliques répétées il perd graduellement cette propriété qu'il devait sans doute à des traces d'acides diaminés. Par addition de soude et de sulfate de cuivre, il donne une coloration rouge violacée qui passe rapidement par nouvelle addition de sel de cuivre au bleu. La solution aqueuse de ce polypeptide précipite par le tannin : le chlorure de platine et l'alcool précipitent une combinaison jaunâtre soluble dans l'eau. Le chlorure ferrique, même en présence du sulfate d'ammoniaque, ne donne aucun précipité. Il en est de même de l'acide chromique du ferrocyanure de potassium et de l'acide acétique. Le bichlorure de mercure donne un précipité volumineux et blanc.

Des corps, sinon identiques, du moins analogues persistent dans la digestion trypsique même prolongée de substances protéiques autres que la caséine. FISCHER et ABDERHALDEN l'ont observé pour l'édésine, l'hémoglobine, la sérumglobuline, l'ovalbumine, la fibrine.

Mais il s'agit là de complexes volumineux dont les relations avec les polypeptides ne peuvent ressortir que d'une communauté dans les propriétés générales et qu'on ne saurait pour l'instant identifier avec des corps connus. Il n'en est pas de même de corps plus simples, isolés dans les conditions expérimentales que je vais indiquer et qui se sont trouvés identiques à des peptides artificiels. La fibroïne de la soie se dissout dans l'acide chlorhydrique fort à froid : en contact avec trois fois son poids de cet acide de densité 1,19, elle donne au bout de 16 heures, à la température du laboratoire, une liqueur qui ne précipite plus par l'alcool ; elle s'est transformée en un corps

(1) E. FISCHER et E. ABDERHALDEN. — *Über die Verdauung einiger Eiweisskörper durch Pankreasfermente.* Z. ph. Ch., XXXIX, 81, 1903, et *Über die Verdauung des Caseins durch Pepsinsalzsäure und Pankreasfermente.* Z. ph. Ch., XI, 215, 1903.

de la nature des peptones. Extrait de sa solution chlorhydrique, ce corps peptonique, mis en présence de trypsine, est digéré avec séparation de tyrosine. Il en résulte une autre peptone, différant de la première par l'absence de cet amino-acide phénolique; cette peptone, traitée pendant 1 à 2 heures à 90° par l'eau de baryte, donne, entre autres produits, un corps que FISCHER (1) et ABBERHALDEN (2) caractérisent comme la glycyl-d-alanine. Ultérieurement (3) ils caractérisent la glycyl-g-tyrosine dans les produits d'hydrolyse de cette même fibroïne, la glycyl-g-leucine dans les produits d'hydrolyse de l'élastine.

De leur côté, LEVENE et BEATTY (4) ont isolé des produits de digestion tryptique de la gélatine l'anhydride de la glycyl-proline.

Il n'est donc pas douteux que l'on pourra retirer des digestions tryptiques des séries de corps en tout semblables aux peptides artificiels.

Le mode de liaison des acides aminés, tel qu'il existe dans les peptides, existe dans les substances protéiques elles-mêmes. La conception d'E. FISCHER trouve dans ces faits une très belle vérification expérimentale.

*
* *

Si maintenant nous voulons exprimer en peu de mots, l'ensemble des données relatives à l'action de la trypsine que nous venons de parcourir, nous dirons que cette diastase détache de la molécule protéique une série d'acides aminés, en commençant par la tyrosine; c'est un effeuillement progressif et continu, hâtif au début, puis très ralenti, ce qui permet d'isoler au passage des termes comme les anti-peptones de M. SIEGFRIED et les peptides de M. E. FISCHER de même que par l'hydrolyse acide

(1) E. FISCHER. — Uber die Hydrolyse der Proteinstoffe. *Chem. Ztg.*, XXVI, 939, 1902.

(2) E. FISCHER et E. ABBERHALDEN. — Bildung eines Dipeptids bei der Hydrolyse des Seidenfibroïns. *Ber. chem. Ges.*, XXXIX, 752, 1906.

(3) E. FISCHER et E. ABBERHALDEN. — Bildung von Dipeptiden bei der Hydrolyse der Proteinstoffe. *Ber. chem. Ges.*, XXXIX, 2315, 1906.

(4) LEVENE et BEATTY. — Ueber das Vorkommen von Prolinglyclanhydrid bei der tryptischen Verdauung der Gelatine. *Ber. Chem. Ges.*, XXXIX, 2060, 1906.

modérée de ces mêmes protéines on peut isoler les kyrines de SIEGFRIED ou les peptides de E. FISCHER).

Le fait que certains complexes de la nature des peptides présentent dans la digestion des substances protéiques une résistance au moins relative à l'action de la trypsine nous conduit à envisager la façon dont ce ferment se comporte vis-à-vis des peptides artificiels.

..

1). Action de la trypsine sur les peptides. Recherches d'E. Fischer et de ses collaborateurs.

E. FISCHER et ses collaborateurs P. BERGELL (1) et E. ABDERHALDEN (2) ont vu que la trypsine ne dédouble pas indifféremment tous les peptides, elle hydrolyse certains, elle laisse d'autres inattaqués, — et de leurs observations, ces savants ont déduit certaines règles générales. Mais voici d'abord, brièvement indiquée, la technique qu'ils ont employée.

Le polypeptide est dissous dans l'eau, additionné de quelques cent. cubes de suc pancréatique activé et d'une petite quantité de toluène. On conserve à l'étuve à 36° pendant un temps plus ou moins long (de 1 à 15 jours).

Le polarimètre permet de suivre très simplement la marche du phénomène.

Les polypeptides sont ou inactifs sur la lumière polarisée ou actifs. Leurs produits d'hydrolyse sont tous, à part le glyco-colle, doués d'activité optique. S'agit-il d'un polypeptide racémique, l'apparition du pouvoir rotatoire prouvera le dédoublement. S'agit-il d'un polypeptide actif, un changement dans le pouvoir rotatoire accompagnera la décomposition.

Naturellement, quand les produits d'hydrolyse sont repré-

(1) E. FISCHER et P. BERGELL. — Ueber die Derivate einiger Dipeptide und den Verhalten gegen Pankreasfermente. *Ber. chem. Ges.*, XXXVI, 2592 (1903). — Spaltung einiger Dipeptide durch Pankreasferment. *Ber. chem. Ges.*, XXXVII, 3103 (1904).

(2) E. FISCHER et E. ABDERHALDEN. — Ueber das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft. *Z. ph. Ch.*, XLVI, 52, 1905. — Ueber das Verhalten einiger Polypeptide gegen Pankreassaft. *Z. ph. Ch.*, LI, 264, 1907.

sentés uniquement par du glycocolle, on ne peut utiliser le polarimètre.

Pour caractériser chimiquement les produits de l'hydrolyse, il est indispensable de les isoler. Quand ils sont peu solubles, comme la tyrosine et la cystine, ils cristallisent au cours de l'essai. Dans les autres cas, on les transforme en chlorhydrates d'éthers éthyliques; on fait cristalliser d'abord, s'il y a lieu, le chlorhydrate de l'éther du glycocolle, on sépare l'éther de l'alanine par distillation sous pression très réduite. Le résidu est traité par l'éther de pétrole qui dissout les éthers des aminoacides simples comme la leucine, la phénylalanine, tandis que les éthers des polypeptides restent indissous.

Du mélange des éthers de polypeptides, les dipeptides sont précipités sous forme de diacipipérazines par addition d'ammoniaque alcoolique.

Les auteurs se sont assuré par des essais préliminaires que cette méthode permet de séparer facilement acides aminés, dipeptides, tripeptides d'un mélange, sans que ces derniers soient décomposés au cours des opérations.

Le tableau ci-après résume les essais qui ont porté sur 38 polypeptides.

Le suc pancréatique kinasé :

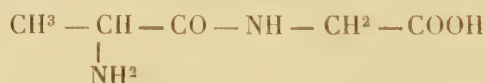
hydrolyse :	n'hydrolyse pas :
	glycyl-glycine
	d-alanyl-l-alanine
* alanyl-alanine	l-alanyl-d-alanine
d-alanyl-d-alanine	glycyl-alanine
* alanyl-glycine	l-leucyl-d-leucine
l-leucyl-l-leucine	d-leucyl-l-leucine
	leucyl-leucine
	l-leucyl-glycine
	leucyl-glycine
	leucyl-alanine
d-alanyl-l-leucine	alanyl-leucine B
* alanyl-leucine A	
* leucyl-isosérine A	
glycyl-l-tyrosine	
leucyl-l-tyrosine	

hydrolyse :	n'hydrolyse pas :
	aminobutyryl-glycine
	ac. aminobutyryl-aminobutyrique A
	ac. aminobutyryl-aminobutyrique B
	amino-isovaleryl-glycine
	glycyl--phénylalanine
	leucyl-proline
ac. l-leucyl-d-glutamique	
* alanyl-glycyl-glycine	
* leucyl-glycyl-glycine	
* glycyl-leucyl-alanine	
* alanyl-leucyl-glycine	
dialanyl-cystine	
dileucyl-cystine	
tétraglycyl-glycine	diglycyl-glycine
éther éthylique de la triglycyl-glycine	triglycyl-glycine
	dileucyl-glycyl-glycine

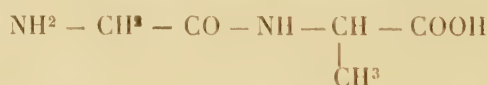
L'examen de ce tableau montre que l'attaque des peptides par le ferment pancréatique dépend de plusieurs facteurs.

1° Influence de la structure.

L'alanyl-glycocolle (alanyl-glycine)



est dédoublé. Son isomère, la glycylalanine



ne l'est pas.

2° Influence de la nature des acides aminés.

Si l'on rapproche des dipeptides entre lesquels la comparaison s'établit facilement, on remarque par exemple que l'hydrolyse a lieu quand l'alanine fonctionne comme radical acide, c'est ainsi que l'alanyl-glycine, l'alanyl-alanine, l'alanyl-l-leucine sont dédoublées.

Il en est de même pour les oxyacides tyrosine et isosérine, quand ils occupent l'extrémité de la chaîne, ce qui est peut-être dû à leur caractère électronégatif.

On pourrait interpréter de même la facilité d'hydrolyse des 2 dérivés de la cystine, bien qu'ici la longueur de la chaîne entre sans doute en jeu. Il faut au contraire remarquer la résistance des dipeptides, chez lesquels l'acide α -amino-butyrique, l'acide α -amino-valérianique et la leucine entrent en qualité de radicaux acides ; les deux derniers amino-acides sont pourtant très répandus dans la nature.

3° Influence de la configuration.

Dans le cas où les polypeptides hydrolysés sont des racémiques (ils sont marqués d'une astérique dans la première colonne du tableau), l'hydrolyse n'est que partielle ; elle intéresse la moitié seulement du racémique, et l'on ne trouve dans les produits de l'hydrolyse que des amino-acides actifs, faisant partie de la molécule de substances protéiques naturelles.

Cette règle est très importante à retenir, elle permet de déterminer la configuration de certains polypeptides.

Exemple :

Il existe 4 alanyl-leucines et on peut imaginer 2 racémiques A et B.

$$\begin{array}{l} \text{A. } \left\{ \begin{array}{l} \text{d-alanyl-l-leucine} \\ \text{l-alanyl-d-leucine} \end{array} \right. \\ \text{B. } \left\{ \begin{array}{l} \text{d-alanyl-d-leucine} \\ \text{l-alanyl-l-leucine} \end{array} \right. \end{array}$$

L'observation montre que, des 4 combinaisons actives, seule la d-alanyl-l-leucine est dédoublée par le ferment ; la combinaison racémique A ne peut donc être que la combinaison d-alanyl-l-leucine + l-alanyl-d-leucine.

En voici un second exemple : la leucyl-leucine n'était autrefois connue que sous une forme racémique ; elle n'est pas attaquée par le suc pancréatique. Or, nous savons aujourd'hui, que la l-leucyl-l-leucine est hydrolysée par ce suc ; on est donc amené à admettre que ce racémique est la combinaison : l-leucyl-d-leucine + d-leucyl-l-leucine. On peut donc utiliser l'action du suc pancréatique pour déterminer la configuration de certains polypeptides.

4° Influence du nombre des acides aminés.

La comparaison des peptides renfermant du glyco-colle est ici instructive.

La glycyl-glycine, la diglycyl-glycine, la triglycyl-glycine, ne sont pas attaquées; la tétraglycyl-glycine l'est.

Il est remarquable que la base biurétique de Curtius, qui, d'après les recherches de ce savant, est l'éther éthylique de la triglycyl-glycine, soit également hydrolysée. Il semble que les facteurs déterminants de l'hydrolyse soient, dans le premier cas, la longueur de la chaîne, dans le second cas l'éthérification du carboxyle.

L'influence de la longueur de la chaîne paraît évidente dans le cas de la leucyl-glycyl-glycine qui est hydrolysée alors que la leucyl-glycine ne l'est pas. Pourtant la dileucyl-glycyl-glycine n'est pas hydrolysée, ce qui tient peut-être à la structure du groupement « dileucyl ». Il paraît en réalité assez difficile d'énoncer ici une règle générale.

5° Influence de la nature du ferment.

Dans ses premiers essais, E. FISCHER utilisait des pancréatines commerciales. Ces préparations sont obtenues au moyen de pancréas d'animaux et peuvent renfermer des diastases que ne renferme pas le suc pancréatique normal.

En voici une preuve : la leucyl-alanine est inattaquable par le suc pancréatique frais activé; elle est au contraire partiellement dédoublée par la pancréatine.

On voit de quelle importance il est, pour l'étude de l'hydrolyse trypsique des protéiques ou des peptides, de se servir de solutions fermentaires ne pouvant pas renfermer, à côté de la trypsine, d'autres diastases protéo-ou peptolytiques.

Dans les essais systématiques exposés ici, E. FISCHER s'est uniquement servi du suc pancréatique, que lui avait fourni le professeur PAWLOW, suc obtenu par fistule. Ce suc avait été additionné d'une trace de thymol, et il était, avant l'emploi, activé par addition de 5 % de suc intestinal.

* *

E. *Faits particuliers relatifs à l'hydrolyse trypsique de quelques substances protéiques autres que des protéines.*

La trypsine dédouble les *protamines*, tandis que la pepsine chlorhydrique ne les attaque pas. L'hydrolyse est complète; elle fournit les trois bases hexoniques, arginine, histidine, lysine, et une petite quantité d'acides mono-aminés.

Les termes de passage des protamines aux bases hexoniques sont désignés sous le nom de *protones*. En faisant digérer du sulfate de sturine par de la trypsine, KOSSEL et MATTHEWS (1) isolent sous forme de combinaison argentique un corps de formule $C^{48}H^{35}N^7O^5$ qui résulterait de la soudure d'une molécule d'histidine et de deux molécules de lysine avec élimination d'une molécule d'eau.



KOSSEL compare la structure de ce corps à celle des hexotrioses et par analogie propose d'appeler « hexotriones » les composés de ce type.

La trypsine digère énergiquement la *caséine*. Nous avons déjà fait allusion à quelques particularités intéressantes de cette hydrolyse. Il suffit de rappeler les travaux de FISCHER et d'ABDERHALDEN, d'ABDERHALDEN et VÆGTLIN déjà cités (Voir aussi caséase).

Sur les *nucléoprotéïdes*, la trypsine agit en décomposant le complexe protéinique de la molécule avec formation d'albumoses, de peptones, d'acides aminés, comme dans le cas général et en laissant inaltéré l'acide nucléique (UMBER) (2). La trypsine est donc différente de la *nucléase* qui décompose les acides nucléiques avec mise en liberté de bases puriques

(1) KOSSEL et MATTHEWS. — Zur Kenntniss der Trypsinwirkung. *Z. ph. Ch.*, XXV, 190, 1898.

KOSSEL et PRINGLE. — Über Protamine und Histone. *Z. ph. Ch.*, XLIX, 301, 1906.

(2) F. UMBER. — Ueber die fermentative Spaltung der Nucleoproteide. *Z. f. Klin. Med.*, XLII, 381, 1901.

(SACHS) (1). ABDERHALDEN et SCHITTENHELM (2) ont constaté que le suc pancréatique, activé ou non, liquéfie l' α -thymonucléate de soude, mais ne le décompose pas avec formation de bases puriques, tandis que les extraits de glandes pancréatiques renferment une nucléase active (Voir plus loin nucléase).

La gélatine est facilement liquéfiée et décomposée par la trypsine. Cette décomposition s'accompagne, contrairement à ce qu'avait avancé KÜHNE (3), de mise en liberté de leucine.

HARLAY (4) a constaté la formation de ce corps et REICH-HERZBERGE (5) l'a isolé en nature et caractérisé.

La gélatine hydrolysée par les ferments et par les acides ne fournit pas de tyrosine.

KRÜGER (6) a étudié une glutine antipeptone β . LEVENE (7) a isolé des produits de digestion trypsique de la gélatine un corps $C^{11}H^{10}N^2O^2$; en collaboration avec BEATTY (8) il a montré que ce corps est l'anhydride de la glycyl-proline, observation d'autant plus intéressante que c'est le premier anhydride de dipeptide qu'on ait obtenu par l'intermédiaire de la seule digestion trypsique.

On s'est demandé si la trypsine elle-même n'est pas un nucléo-protéide.

LEVENE (9), pour tenter d'éclairer la nature chimique de ce ferment, a institué des expériences qui l'amènent à conclure que la trypsine ne paraît pas être un protéide, mais ses expériences ne sont pas bien démonstratives.

(1) SACHS. — Ist die Nuclease mit dem Trypsin identisch? *Diss. Heidelberg*, 1905.

(2) ABDERHALDEN et SCHITTENHELM. — Der Ab- und Aufbau der Nucleinsäuren im thierischen Organismus. *Z. ph. Ch.*, XLVII, 452, 1906.

(3) KÜHNE. — Verhandl. der naturhist. und Ver. zu Heidelberg. *N. F.*, 1877, I. p. 198.

(4) HARLAY. — *Thèse citée*.

(5) REICH-HERZBERGE. — Ueber die Einwirkung von Trypsin auf Leim. *Z. ph. Ch.*, XXXIV, 119, 1901.

(6) KRÜGER. — Zur Kenntniss der tryptischen Verdauung des Leims. *Z. ph. Ch.*, XXXVIII, 320, 1903.

(7) LEVENE. — *J. of exper. Med.*, VIII, 180, 1906, d'après les suivants.

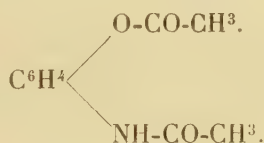
(8) LEVENE et BEATTY. — Ueber das Vorkommen von Prolinglycylanhydrid bei der tryptischen Verdauung der Gelatine. *Ber. chem. Ges.*, XXXIX, 2060, 1906.

(9) LEVENE. — *The american journal of Physiology*, V, 298, 1901.

La trypsine diminue l'activité de certains ferments quand on la met en contact avec eux dans les conditions de réaction qui favorisent son action propre ; elle agit ainsi vis-à-vis de la pepsine (BAGINSKI) (1), (HARLAY) (2), vis-à-vis de la nucléase (SACHS) (2). Elle ne paraît pas diminuer l'activité de la papaine (HARLAY) (2).

On s'est préoccupé de rechercher si la trypsine est susceptible d'hydrolyser des composés chimiques divers, de constitution connue. Plusieurs de ces essais ont été entrepris dans le but de vérifier certaines idées théoriques relatives à la structure des substances protéiques.

GULEWITSCH (3) étudie 19 corps présentant des fonctions chimiques variées, éthers-sels, éthers-oxydes-phénoliques, amides, anilides, urées composées, etc. Citons parmi les corps essayés : la phénacétine, l'acétanilide, le salol. La para-diacétyl-phénolamide



paraît cependant avoir été attaquée.

A propos de l'acide hippurique, GULEWITSCH n'est pas d'accord avec BLANK (4) qui l'avait donné comme attaqué par la trypsine.

SCHWARZSCHILD (5) de son côté a tenté des expériences analogues sur des corps généralement à fonction amide et sur quelques corps donnant la réaction du biuret. Presque tous les corps essayés, tels l'asparagine, l'urée, l'acétamide, l'acide hippurique, la pipérazine ont résisté à l'action de la diastase. La base glycocollique de Curtius a été dédoublée.

(1) BAGINSKI.— Ueber das Vorkommen und Verhalten einiger Fermente. *Z. ph. Ch.*, VII, 209, 1883.

(2) *Loc. cit.*

(3) GULEWITSCH.— Ueber das Verhalten des Trypsins gegen einfachen chemischen Verbindungen. *Z. ph. Ch.*, XXVII, 541, 1899.

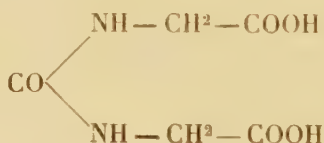
(4) BLANK.— Cité d'après GULEWITSCH.

(5) SCHWARZSCHILD.— Ueber die Wirkungsweise des Trypsins. *Hofm. Beit.*, IV, 155, 1903.

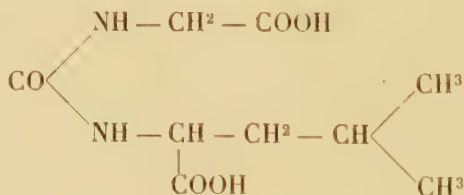
GONNERMANN (1) essaie l'action de la trypsine sur quelques amides et acides amidés. Les acides oxamique et succinamique, la dibenzamide, la disalicylamide ne subissent aucune transformation : la succinimide et la phthalimide seraient attaquées.

OTTO WARBURG (2) trouve que la trypsine provoque un dédoublement asymétrique de l'éther éthylique de la leucine racémique. On obtient de la leucine gauche et l'éther éthylique de la leucine droite reste inaltéré. Ce serait même là une bonne méthode de préparation de la leucine naturelle. L'essai a été fait avec de la pancréatine dont on a éliminé la lipase par macération alcaline.

Enfin M. A. MOREL (3) a examiné l'influence de la trypsine sur des urées substituées, des acides amidés dérivés des albumines : urée du glycocolle



urée du glycocolle et de la leucine

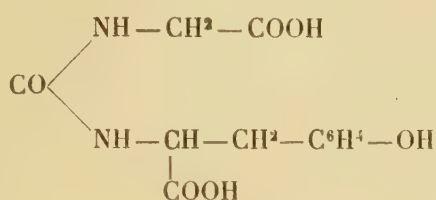


(1) GONNERMANN. — Ueber die Verseifbarkeit einiger Saureimide (Diamine) und Aminosäuren durch Fermente. *Pflüg. Arch.*, XCV, 278, 1903.

(2) OTTO WARBURG. — Spaltung des Leucin-æthyl-esters durch Pankreasferment. *Ber. chem. Ges.*, XXXVIII, 187, 1905, et *Z. ph. Ch.*, XLVIII, 205, 1906.

(3) ALBERT MOREL. — Soudure des acides amidés dérivés des albumines. *C. R.*, CXLIII, 119, 1906.

urée du glycolle et de la tyrosine



Ces essais sont restés négatifs et ont ainsi apporté un argument défavorable à la conception de SCHUTZENBERGER, relative au rôle du noyau urée dans la constitution des protéiques.

SOUS-CHAPITRE IV.

Mesure de l'activité trypsique.

On applique à la mesure de l'activité d'une trypsine, la plupart des méthodes qui servent à la mesure de l'activité pepsique. D'autres s'appliquent plus spécialement à ce ferment.

A propos de ces méthodes, il convient de faire la même observation qu'au sujet des méthodes de dosage de la pepsine. Elles emploient, comme substance protéique d'essai, la fibrine, l'albumine d'œuf, la caséine, la gélatine ou des polypeptides. Ce choix est-il indifférent ? Je ne pense pas qu'il le soit et il me semble que l'on préjuge un peu vite de l'identité de diastases hydrolysant des substances aussi diverses.

La méthode de la fibrine colorée due à GRÜTZNER et modifiée par GEHRIG (1) peut donner des indications utiles, mais sur l'imprécision desquelles il est inutile d'insister.

La méthode des tubes d'albumine coagulée due à METT est applicable à la trypsine ; c'est même en vue de la mesure de l'activité protéolytique de cette diastase, qu'elle a été d'abord établie. La technique est la même dans les deux cas, et il n'y a pas lieu d'en reprendre l'exposé.

La méthode de VOLHARDT, adaptée par LÖHLEIN (2) au titrage de la trypsine, ramenant la manipulation à un simple titrage acidimétrique est d'une application facile, mais on lui préférera une autre méthode titrimétrique que nous ferons connaître tout à l'heure, aussi simple et plus précise.

(1) GEHRIG. — Ueber Fermente im Harn. *Archiv. f. d. ges. Physiol.*, XXXVIII, 38, 85, 1885.

(2) LÖHLEIN. — Ueber die Volhard'sche Methode zur quantitativen Pepsinbestimmung und Trypsinbestimmung durch Titration. *Hofm. Beitr.*, VII, 120, 1905.

H. WEIS (1) donne la méthode suivante :

On met à digérer une quantité connue de caséine par le ferment ; au bout d'un temps donné, on arrête la digestion, précipite la caséine non transformée par l'acide acétique à l'ébullition, et dose l'azote dans une portion aliquote du filtratum ; on en déduit la quantité de caséine digérée par le ferment dans le temps de l'essai.

Les méthodes de FULD (2) et de GROSS (3) sont très analogues. En voici le schéma commun.

On met des volumes égaux de solution de caséine dans des séries de tubes. On ajoute des doses croissantes de ferment. On abandonne au thermostat à 40°. Quelques heures après, on additionne chaque mélange d'acide acétique. Dans les tubes où toute la caséine a disparu, l'acide ne produit ni précipité ni trouble, c'est le contraire dans ceux où la digestion est moins avancée. On conçoit facilement, comment l'on peut, par l'application de cette méthode simple, comparer entre elles des solutions de trypsine au point de vue de leur activité.

VERNON (4) apprécie la valeur digestive d'une pepsine d'après le temps qui est nécessaire au ferment, pour digérer une quantité donnée de fibrine ; la technique qu'il emploie paraît ne pouvoir fournir que des indications assez approximatives.

*
* *

Lorsqu'une substance protéique est soumise à l'action de la trypsine, la conductibilité électrique de la solution va augmentant. La détermination des variations de cette conductibilité, permet d'apprécier rapidement l'activité d'une trypsine, et, avantage plus important, de suivre quantitativement la marche de la protéolyse.

(1) H.-R. WEIS. — Zur Kenntniss der Trypsin-verdauung. *Z. ph. Ch.*, XL, 480, 1904.

(2) FULD. — Die Wirksamkeit des Trypsins und ein einfaches Mittel zu ihre Bestimmung. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, LVIII, 468, 1908.

(3) GROSS. — Die Wirksamkeit des Trypsins und eine einfache Methode zu ihre Bestimmung. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, LVIII, 157, 1907.

(4) VERNON. — The conditions of action of trypsin on fibrin. *The am. J. of physiology*, XXVI, 405, 1901.

Cette méthode a été appliquée à l'étude de l'hydrolyse de la gélatine et de la caséine par MM. V. HENRI et LARGUIER DES BANCELS (1).

*
* *

Les recherches de E. FISCHER et E. ABDERHALDEN ont mis en pleine lumière l'action du suc pancréatique et d'une façon générale des diastases protéolytiques sur les polypeptides. Ces observations permettent de concevoir de nouvelles méthodes d'essai de ces ferments (2).

Une première méthode consiste à faire agir le liquide diastasique à titrer sur un peptide dont l'un des constituants soit facile à isoler, comme la tyrosine, la cystine ou la leucine ; la glycyl-l-tyrosine, la dialanyl-cystine, la d-alanyl-l-leucine sont alors particulièrement recommandables.

La pesée de la tyrosine peu soluble, mise en liberté par la trypsine agissant sur le premier de ces peptides, fournit une mesure de l'activité du ferment.

Malheureusement la tyrosine est loin d'être tout à fait insoluble, et pour obtenir la totalité de la tyrosine libérée, il faudrait recourir à une laborieuse méthode de séparation.

Aussi y a-t-il avantage à s'adresser à des peptides optiquement actifs et à suivre au polarimètre les variations du pouvoir rotatoire du mélange en réaction. On suivra l'hydrolyse diastasique du peptide comme l'on suit au polarimètre l'hydrolyse du saccharose par l'invertine.

Le mélange de la solution du peptide actif et du ferment est placé dans un tube maintenu à 38° par une circulation extérieure d'eau chaude et de temps en temps ou au bout d'un temps donné on examine la déviation polarimétrique.

La d-alanyl-d-alanine se prête particulièrement bien à cette recherche, car le polypeptide a un pouvoir rotatoire prononcé, tandis que celui de la d-alanine est faible. Mais le suc pancréatique n'attaque que très faiblement ce polypeptide.

(1) VICTOR HENRI et LARGUIER DES BANCELS. — Loi de l'action de la trypsine sur la gélatine. — Etude de la digestion de la caséine par la méthode de conductibilité électrique. *C. R. Biologie*, LV, 563, 787, 788 789 (1903).

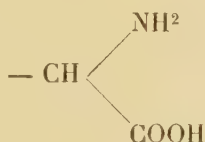
(2) E. ABDERHALDEN et A. KOELKER. — Die Verwendung optisch-aktiver Polypeptide für Prüfung der Wirksamkeit proteolytischer Fermente. *Z. ph. Ch.*, LI., 294 (1907).

En réalité, la méthode présente surtout un intérêt d'un autre ordre ; elle permet de comparer au point de vue de leur activité peptolytique des diastases d'origines diverses et d'établir entre elles un certain classement.

Au point de vue de la mesure de l'activité trypsique, la méthode de SÖRENSEN (1) présente d'incontestables avantages.

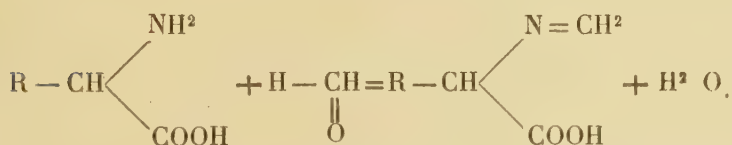
Voyons d'abord sur quel fait elle repose. Le point de départ est une remarque ancienne de SCHIFF. Ce savant avait observé que les solutions neutres d'acides aminés prennent une réaction nettement acide par addition de formaldéhyde. Ce fait s'explique facilement.

Soit un acide α aminé renfermant par conséquent le groupement



La solution de ce corps est sensiblement neutre, l'acidité du carboxyle étant compensée par la basicité du groupement aminogène.

Ajoutons de l'aldéhyde formique ; il se fait la réaction suivante



La fonction basique a disparu et la combinaison méthylénique se comporte comme un acide monobasique.

La solution neutre est devenue acide et l'on peut par un dosage acidimétrique, apprécier cette acidité.

Ceci posé, voici comment l'on procède au titrage d'une solution d'acide-amino.

(1) SÖRENSEN. — Etudes enzymatiques. Sur la mesure quantitative des scissions protéolytiques. Titration au formol. *C. R. des Travaux du laboratoire de Carlsberg*. Copenhague, VII, 1, 1907.

A 50 c³ de formol du commerce à 30 ou 40 % on ajoute 1 c³ de solution alcoolique de phénol phtaléine à $\frac{1}{200}$ puis de la baryte $\frac{N}{5}$ jusqu'à neutralisation. Puis on place 20 c³ par exemple de la solution d'acide aminé. à doser dans un matras conique bouché, on ajoute 10 c³ du formol neutralisé, puis on verse en agitant bien une solution titrée de baryte ($\frac{N}{5}$ par exemple) jusqu'à coloration rouge nette après quoi on ajoute encore 2 à 3 c³ de baryte afin d'avoir un excès suffisant pour pouvoir, s'il y a lieu, précipiter les carbonates et les phosphates. Cela fait, on titre en retour avec de l'acide chlorhydrique au $\frac{1}{5}$ jusqu'à ce que la couleur de la solution soit plus faible que celle de la liqueur de contrôle; après quoi on ajoute goutte à goutte de la baryte jusqu'à ce qu'on ait atteint la couleur de la liqueur type.

Il est avantageux de pousser le virage au rouge vif et d'obtenir une intensité de coloration égale à celle qu'on a obtenue dans le titrage préalable d'une liqueur de comparaison.

Celle-ci se prépare de la façon suivante : 20 c³ d'eau bouillie sont additionnés de 10 c³ formol neutralisé puis de 5 c³ de baryte. On titre avec HCl qu'on ajoute goutte à goutte jusqu'à ce que le liquide ne présente plus qu'une teinte rose faible : on ajoute alors trois gouttes de baryte pour faire prendre à la liqueur type une couleur rouge très vif.

On peut au lieu de baryte utiliser une solution titrée de soude. SÖRENSEN a pu également remplacer la phénolphtaléine par la thymolphtaléine qui donne un virage au bleu intense, mais qui vire pour une quantité d'alcali une peu plus grande que la phtaléine du phénol. Il faut dans ce cas ajouter de l'alcool au liquide à cause de la faible solubilité de l'indicateur dans l'eau.

En opérant dans ces conditions, on obtient de bons résultats avec le glycocolle, l'alanine, la leucine, les acides aspartique, glutamique, amino-adipique, avec l'ornithine, la lysine, la sérine, l'asparagine. Avec la proline, les résultats sont un peu faibles, avec la tyrosine un peu forts.

Parmi les peptides, la glycyl-glycine se laisse titrer comme un acide monobasique ordinaire.

Enfin, et nous atteignons ici l'application que nous visons, il est possible de déterminer de la même façon dans un mélange d'acides aminés ou dans un liquide de digestion trypsique (et l'on conçoit que la méthode puisse s'appliquer aux produits de protéolyse par d'autres diastases), la quantité de carboxyles libres.

SÖRENSEN exprime les résultats en azote. Le nombre de c³ de

baryte N au $\frac{1}{5}$ consommé, multiplié par 2,8 donne la quantité correspondante d'azote en milligrammes.

On a ainsi en main un moyen pratique pour mesurer l'activité de la trypsine et suivre la marche de la protéolyse.

Une difficulté à prévoir dans l'application de cette méthode résulte de la coloration jaune ou jaune-brunâtre que peuvent présenter les liquides de digestion, coloration qui peut rendre le titrage assez délicat. Il est bon dans ce cas d'ajouter à la liqueur de contrôle de petites doses de substances colorantes convenablement choisies (Tropéoline OO, brun Bismark, etc.) afin de lui donner une couleur semblable à celle des solutions à examiner.

SÖRENSEN et JESSEN-HANSEN (1) ont de plus prévu le cas de liqueur très colorées avec lesquelles cette méthode corrective serait insuffisante. Ce cas ne se présente guère, il est vrai, avec les liquides de digestion diastasique, mais plutôt avec les liqueurs provenant de l'hydrolyse acide des protéiques. Les auteurs effectuent alors la décoloration en ajoutant au liquide contenant une proportion convenable d'acide chlorhydrique, du nitrate d'argent ; il se fait un précipité de chlorure d'argent qui entraîne les substances colorées. On élimine l'excès d'argent par le chlorure de baryum.

Pour les détails techniques, nous renvoyons au mémoire original.

*
* *

Il paraît prématuré d'écrire la loi d'action de la trypsine.

La relation qui lie la vitesse de digestion à la quantité de ferment a été énoncée dans les mêmes termes que pour la pepsine.

« La loi de SCHÜTZ et BORISSOW, dit PAWLOW (2), est applicable dans toute sa rigueur à la trypsine, c'est-à-dire que la vitesse de digestion est proportionnelle à la racine carrée de la

(1) SÖRENSEN et JESSEN-HANSEN. — Sur la titration au formol de solutions fortement colorées. *C.R. des Travaux du laboratoire de Carlsberg*. Copenhague, VII, 58, 1908.

(2) PAWLOW. — Travail des glandes digestives. Trad. Pachon et Sabrazès, p. 40.

quantité de ferment. Mais les expériences de BAYLISS (1) et d'HEDIN (2) infirment cette assertion. Pour de petites quantités de trypsine — et au commencement de la digestion — l'effet est proportionnel à la quantité de trypsine, et, pour de grandes quantités, non.

En ce qui concerne le facteur temps, l'expérience montre que, pour de petites quantités, l'effet est au commencement de la digestion proportionnel au temps, mais qu'ensuite il y a une chute.

La quantité de produit digéré est donc, au début, proportionnelle au produit de la quantité de trypsine par le temps de digestion. Par conséquent, pour obtenir le même effet avec des quantités différentes de trypsine, le temps de digestion doit être en raison inverse des quantités de trypsine.

Si on examine l'influence de la quantité de substances à transformer sur la rapidité de la digestion, on voit que la vitesse de digestion rapportée à l'unité de substances à transformer augmente, quand diminue la quantité totale de celle-ci et finalement devient constante.

MM. Victor HENRI et LARGUIER DES BANCELS (3) qui, des premiers, se sont occupés d'établir la loi d'action de la trypsine, ont appliqué à cette étude la méthode de conductibilité électrique. Cette méthode leur a permis de suivre quantitativement l'action de la trypsine sur la gélatine et sur la caséine et de donner une expression mathématique de cette loi. Au début de la digestion, pendant la première heure, la variation de conductibilité électrique peut être représentée par la loi logarithmique et ce résultat rapproche l'action de la trypsine, au moins à ses débuts, de celle des ferments des hydrates de carbone.

(1) BAYLISS. — The Kinetics of Tryptic Action. *Arch. des Sc. biologiques*, XI, Suppl. 261, 1904.

(2) HEDIN. — Observations of the action of Trypsin. *J. of physiology*, XXXII, 468, 1908. Voir aussi LÖHLEIN, *loc. cit. Hofm. Beitr.*, VII, 120, 1905 et FAUBEL, Untersuchungen über den menschlichen Bauchspeichel und das Fermentgesetz der Trypsin. *Hofm. Beitr.*, X, 35, 1907.

(3) Victor HENRI et LARGUIER DES BANCELS. — *Loc. cit.*

SOUS-CHAPITRE V.

Applications pharmaceutiques. Pancréatines officinales. — Leur essai.

On emploie en pharmacie, sous le nom de *pancréatine*, un extrait de pancréas qui renferme à côté de la diastase protéolytique au moins deux autres diastases, une amylase, ferment saccharifiant qui transforme les matières amylacées en dextrines et en maltose, et un ferment saponifiant, la stéapsine, qui dédouble la monobutyryne en acide butyrique et glycérine, mais n'agit que très lentement sur les matières grasses proprement dites.

La pancréatine est inscrite pour la première fois au Codex français dans le Supplément, paru en 1895. On se rappelle son mode de préparation (Voir page 178).

C'est un extrait aqueux de pancréas préparé à basse température.

La technique opératoire du Codex peut être perfectionnée ; il est particulièrement avantageux d'effectuer la concentration dans le vide. Pourtant M. CHOAY, qui a comparé deux pancréatines préparées par lui-même, l'une par le procédé officiel, l'autre par concentration dans le vide, a trouvé que ces deux préparations avaient la même activité protéolytique et amylolytique (il faut pourtant remarquer que M. CHOAY n'a pas déterminé les titres-limites de ces deux préparations) ; toutefois la préparation officinale avait un pouvoir saponifiant (vérifié sur la monobutyryne), notablement moindre, égal tout au plus aux $\frac{3}{5}$ du pouvoir saponifiant de l'extrait dans le vide.

La pancréatine du Supplément du Codex de 1895 est dite : *Pancréatine médicinale* ; cette qualification apparaît comme

malencontreuse quand on la rapproche de l'expression de *Pepsine médicinale*, du Codex de 1884. Celle-ci est en effet une pepsine amylacée, tandis que la pancréatine médicinale est une pancréatine extractive, non additionnée d'amidon.

C'est à la faveur de cette confusion de mots que se sont introduites dans les pharmacies, des pancréatines amylacées, préparations non officinales, illogiquement conçues, et dont le moindre tort est de ne pas répondre aux conditions de titre exigibles.

Le Codex de 1908 écrit *pancréatine* sans adjectif et définit ce médicament une « sorte d'extrait aqueux de pancréas préparé à froid ».

La pancréatine des pharmacies se présente sous l'aspect d'une poudre blanc-jaunâtre, quelquefois sous l'aspect de paillettes jaune pâle; elle est incomplètement soluble dans l'eau et dans l'alcool faible (20° à 30°); elle est assez facilement altérable, elle perd son activité quand on chauffe ses solutions au-dessus de + 50°. Le Codex de 1908 dit : « Son action sur les matières protéiques s'exerce en milieu neutre ou très légèrement alcalin, ou très légèrement acide » — c'est un point que nous avons développé antérieurement — « elle les dissout en les transformant en peptones » — peut-être sans dépasser les limites de la courte monographie que l'on peut consacrer dans une pharmacopée à chaque médicament, le Codex aurait-il pu ajouter « et en corps plus simples, des acides aminés comme la leucine et la tyrosine ». « Elle saccharifie l'amidon et émulsionne les corps gras ». On voit que le Codex fait allusion aux propriétés émulsionnantes et ne dit rien des propriétés saponifiantes.

La pancréatine n'est pas inscrite dans toutes les Pharmacopées. Elle est mentionnée dans les Pharmacopées anglaise (1898), italienne 1902, espagnole 1905 et dans celle des Etats-Unis (1905). Elle ne l'est pas dans les Pharmacopées belge (1906) et suisse (1907). La pancréatine anglaise est un extrait fluide (*Pancreatic solution*), préparé par macération de pancréas divisés, broyés avec du sable, dans de l'alcool faible pendant quelques jours.

*
* *

L'essai de la pancréatine figure au Supplément de 1895 et au Codex de 1908. Cet essai vise seulement la détermination de sa « puissance d'action sur les matières protéiques et sur les matières amylacées ». Voici le texte de l'essai tel qu'il figure au dernier Codex :

La pancréatine doit répondre aux essais suivants qui visent son action sur les matières protéiques et son action sur les matières amylacées :

1° Pour s'assurer de la puissance d'action sur les matières protéiques, prenez :

Pancréatine.....	vingt centigrammes..	0,20
Eau distillée.....	soixante grammes...	60
Fibrine desséchée.....	deux gr. cinquante cg.	2,50

Dans un bain-marie ou une étuve chauffée à $+50^{\circ}$, placez un flacon contenant la fibrine desséchée et l'eau ; laissez digérer pendant une demi-heure ; ajoutez la pancréatine et faites digérer pendant six heures en ayant soin, au début, d'agiter assez fréquemment le mélange jusqu'à dissolution complète de la fibrine, et ensuite toutes les heures environ. Filtrez.

10 centimètres cubes de la liqueur ainsi obtenue ne doivent pas se troubler, à la température ordinaire, par l'addition de vingt gouttes d'acide azotique officinal.

Dans cet essai, on peut remplacer les 2 gr. 50 de fibrine desséchée par 10 grammes de fibrine essorée ; il faut alors réduire à 52 gr. 50 la proportion d'eau distillée.

2° Pour s'assurer de la puissance d'action de la pancréatine sur les matières amylacées :

Préparez 100 grammes d'empois renfermant 5 grammes de fécule de pomme de terre, en vous conformant aux indications données pour l'essai de la diastase (page 194 du Codex). Ajoutez 5 centigrammes de pancréatine pure, chauffez à $+55^{\circ}$ au bain-marie ou à l'étuve, et maintenez cette température pendant une heure, en agitant de temps en temps. Vous devrez obtenir un liquide fluide, filtrant facilement et réduisant à l'ébullition quatre fois son volume de solution cupro-alkaline titrée.

Ce texte n'appelle pas bien des commentaires. L'essai de l'activité protéolytique est calqué sur celui de la pepsine. Ici l'essai se fait en milieu neutre. La fibrine humide peut remplacer la fibrine sèche. Rapporté à la première, le titre de la pancréatine est dit titre 50. C'est un titre minimum, non un titre limite. Ce dernier pourrait être facilement déterminé en s'inspirant de la technique que j'ai rapportée, page 75, d'après M. MACQUAIRE.

Le pouvoir amylolytique est, dans cette édition du Codex, plus élevé que dans le Supplément de 1895. Cinq centigrammes de pancréatine doivent saccharifier dans les conditions indiquées 5 gr. de fécule.

Le Codex ne détermine pas le pouvoir saponifiant. Cette détermination peut être faite avec la monobutyryne en suivant la technique de M. HANRIOT.

Il importe que le praticien ne néglige pas les essais prescrits par le Codex. Les pancréatines du commerce sont parfois sujettes à caution, telle celle dont M. CHOAY rapporte l'essai dans le travail auquel j'ai déjà fait allusion. Peut-être aussi serait-il utile de compléter ces examens chimiques par un examen microscopique qui permettrait de caractériser rapidement certaines substances étrangères comme l'amidon (1).

Les Pharmacopées étrangères donnent des méthodes d'essai analogues à celles que donne notre Codex. Les pharmacopées anglaise et américaine font l'épreuve de protéolyse sur le lait et non sur la fibrine.

*
* *

La pancréatine doit être conservée en flacons bouchés à l'abri de la chaleur et de l'humidité.

Elle n'est la base d'aucune préparation officinale, il convient de l'administrer sous forme de pilules cirées ou kératinées.

Les préparations liquides, telles que vins, sirops, élixirs, sont de mauvaises préparations, non seulement en raison de l'atténuation que leurs véhicules apportent à l'activité des diastases mais encore parce que celles-ci traversant l'estomac sans protection aucune, sont détruites par la pepsine et l'acide chlorhydrique, et ne sauraient arriver intactes dans l'intestin où se trouveraient réalisées les conditions favorables à leur action. La forme de cachets, pour cette même raison, ne paraît pas davantage recommandable.

(1) De leurs recherches sur l'antikinase, MM. DASTRE et STASSANO ont déduit une méthode complémentaire d'essai des trypsines commerciales basée sur l'emploi de cet anticorps. Une macération d'ascarides (antikinase) doit plus ou moins empêcher la digestion d'un cube d'albumine. Je ne rapporte ce fait qu'incidemment, car il ne paraît pas susceptible d'application professionnelle.

Le Codex signale les acides, les alcalis concentrés, le tannin et les matières astringentes comme incompatibles.

On a mis à profit les propriétés émulsionnantes de la pancréatine pour préparer des émulsions de substances grasses thérapeutiques comme l'huile de foie de morue.

Depuis que les travaux de PAWLOW ont mis à jour l'importance de la sécrétion entérique comme agent d'activation de la trypsine pancréatique, on a préconisé : soit l'emploi d'extraits de muqueuse intestinale, soit l'emploi combiné de ces extraits et d'extraits pancréatiques. Telles sont l'eukinase et la pancréatokinase de MM. HALLION et CARRION ; on inclut ces produits dans des capsules de gluten ou on les incorpore dans une pâte de gluten qu'on réduit en une sorte de granulé.

CHAPITRE III.

PRODUITS PHARMACEUTIQUES

résultant de l'action de la pepsine et de la trypsine.

Peptones officinales.

Le mot peptone a perdu pour le chimiste le sens qu'il avait il y a encore peu d'années ; nous avons vu comment la valeur de ce mot s'est modifiée et il n'y a pas lieu d'y revenir ici. Les peptones dont nous parlerons dans ce chapitre, sont les *peptones médicinales*.

Nous parlerons de *peptones pepsiques*, de *peptones pancréatiques*, mais il importe de préciser dès maintenant que ces expressions, qui désignent ici des substances médicinales, ne doivent pas prêter à confusion avec les peptones pepsiques et les peptones tryptiques, dont il a été précédemment question dans un sens plus restreint.

..

§ 1^{er}. *Préparation.*

Le Codex de 1908 définit les peptones médicinales « *un mélange de composés solubles obtenus par l'action de la pancréatine ou de la pepsine sur les matières albuminoïdes* ». Il ne formule aucune méthode de préparation. Le Supplément de 1895 donnait le mode opératoire suivant pour la préparation de la peptone pepsique :

Viande de bœuf désossée et dégraissée.....	1.000 gr.
Eau distillée.....	5.000 —
Pepsine extractive dissolvant 50 fois son poids de fibrine.....	20 —
Acide chlorhydrique officinal.....	50 —
Bicarbonate de soude.....	Q. S.

Coupez la viande en petits morceaux et mélangez avec l'eau dans laquelle vous avez préalablement délayé la pepsine : ajoutez la quantité d'acide chlorhydrique prescrite et faites digérer pendant 6 à 8 heures à une température constante de 50°, en agitant fréquemment.

L'opération sera terminée lorsque 10 centimètres cubes du liquide filtré et refroidi ne se troubleront plus par l'addition de 30 gouttes d'acide azotique officinal. Filtrez et saturez exactement l'acide par le bicarbonate de soude, puis évaporez à siccité.

Cette technique est en somme, à quelques détails près, celle qu'avait indiquée M. A. PETIT en 1881 (1). Un kilogramme de viande de bœuf fournit en moyenne 250 grammes de peptone sèche. Ainsi préparée, c'est un produit solide, spongieux ou granulé suivant le mode d'évaporation, de couleur blanc-jaunâtre, d'odeur particulière, de saveur légèrement amère et salée.

Cette peptone renferme une notable proportion de chlorure de sodium, ce qui n'est pas sans inconvénient lorsqu'il s'agit de l'incorporer à un vin, à un sirop ou à un élixir. C'est pour cette raison que M. PETIT a songé à substituer à la peptone chlorhydro-pepsique, une peptone tartro-pepsique. Le mode de préparation de cette peptone est le suivant :

On fait digérer 10 kilogrammes de viande de bœuf par la pepsine (10 gr.), en présence d'acide tartrique (acide 15 gr., eau 10 litres), à la température de 50°. La digestion terminée (on le vérifie comme précédemment), on filtre et l'on fait du filtratum deux parts égales ; l'une est saturée de bicarbonate de soude et ajoutée à l'autre ; il se fait de la crème de tartre dont une partie précipite immédiatement. On filtre, on évapore à consistance sirupeuse, on laisse refroidir ; il se fait encore un dépôt cristallin de crème de tartre. On décante et on évapore à siccité au b. m.

Cette peptone se présente sous l'aspect d'une poudre blanche, légère, très soluble dans l'eau et très hygrométrique. D'après M. PETIT, elle est préférable à la peptone chlorhydro-

(1) A. PETIT.— Sur les Peptones. *J. Ph. Ch.*, [5°], III, 529, 1881.

pepsique pour la préparation des médicaments galéniques tels que vins, sirops, élixirs. M. DENOËYER ⁽¹⁾ reproche à la digestion, en présence d'acide tartrique, d'être beaucoup plus longue qu'en présence d'acide chlorhydrique et de fournir une peptone renfermant une proportion notable de produits de décomposition profonde des albumines comme des acides aminés.

La *peptone pancréatique* s'obtient dans des conditions analogues aux précédentes ; la pancréatine remplace la pepsine et l'on opère en milieu faiblement alcalinisé par le carbonate de soude.

Enfin, en dehors des peptones pepsiques et pancréatiques, l'industrie prépare les *peptones papainiques*, — nous en parlerons à propos de la papaïne, — elle prépare encore des *peptones par l'action de la vapeur d'eau* surchauffée sur la viande. Les premières ne présentent pas grand intérêt pratique et ne sont pas officinales ; les secondes ne le sont pas davantage, elles constituent certains produits commerciaux dont la peptone Kemmerich est le type et représentent des albumines relativement peu transformées, ayant dépassé, mais peu, la phase de syntonisation.

..

§ 2. Distinction.

Les *peptones chlorhydropepsiques* et *pancréatiques* sont de beaucoup, au point de vue professionnel, les plus importantes.

Les phénomènes qui se passent au cours de leur préparation n'exigent aucun développement après l'étude que nous avons faite de l'action de la pepsine, d'une part, et de la trypsine d'autre part, sur les substances protéiques.

Nous savons déjà qu'elles sont constituées surtout par un mélange de diverses albumoses et de peptones au sens res-

(1) DENOËYER. — Composition des peptones de viande. *C. R. du 2. Congrès international de Chimie appliquée*, Paris, 1896, II, p. 93. et *Annales de Pharmacie*, II, 483, 1896.

treint) et nous avons vu quelles méthodes ont été mises en œuvre pour séparer les fragments inégalement volumineux qui résultent de l'hydrolyse diastasique.

Nous savons aussi que ces produits diffèrent suivant leur origine pepsique ou trypsique, et les notions que nous avons acquises vont nous donner un moyen pratique de différenciation des peptones médicinales d'origine pepsique et pancréatique.

Nous savons déjà que la trypsine provoque une décomposition plus hâtive et plus profonde des albumines, qu'elle détache rapidement de la molécule protéique, et cela presque dès le début de la protéolyse, des acides aminés, comme la tyrosine. Ces faits inspirent plusieurs moyens pratiques de différenciation des peptones médicinales.

Le premier repose sur la détermination de leur pouvoir rotatoire. Les *peptones pancréatiques* ont constamment un *pouvoir rotatoire moins élevé que les peptones pepsiques*.

J. BÉCHAMP (1) a vu le premier que, lorsque les matières protéiques sont digérées par le pancréas, leur pouvoir rotatoire baisse davantage que lorsque ces mêmes matières sont digérées par le suc gastrique M. A. PETIT (2) a énoncé le même fait.

M. HARLAY (3) a repris cette observation et montré le parti qu'on en peut tirer. J'emprunte à sa thèse quelques faits et quelques chiffres.

Si l'on compare des digestions pepsiques et pancréatiques de fibrine, faites deux à deux dans les mêmes conditions avec 30 gr. de fibrine fraîche essorée pour 150 gr. de liquide, et à des températures comprises entre 45 et 50° on constate qu'au moment où les liquides cessent de se troubler par l'acide azotique, les rotations observées au polarimètre en tube de 20 cm ont les valeurs suivantes :

Digestions pepsiques	— 5°,22' — 6°,24' — 6°,22'.
— pancréatiques ...	— 3°,6' — 3°,16' — 3°,28'.
Rapport des rotations pepsiques aux rotations pancréatiques.....	1,73 1,96 1,83.

(1) J. BÉCHAMP. — Recherches sur les albuminoses pancréatiques. *C. R.*, XCIV, 883, 1872.

(2) *Loc. cit.*

(3) HARLAY. — Thèse citée. — De l'application de la tyrosinase, etc.

Les quantités de matière dissoute sont d'ailleurs dans les deux cas à peu près égales.

Avec les peptones d'ovalbumine et avec les peptones de viande, on observe des différences de même sens.

Pour deux peptones pepsiques du commerce, M. HARLAY trouve pour une solution à 2 % des déviations de -2° , et $-2^\circ,2$ correspondant à des pouvoirs rotatoires de -50° et $-50^\circ,83$. Une peptone pancréatique du commerce observée dans les mêmes conditions lui donne en rotation de $-1^\circ,28$, correspondant à un pouvoir rotatoire de $-36^\circ,66$.

Les rapports qui existent entre ces valeurs sont 1,36 et 1,38. Il semble donc qu'il puisse suffire de fixer les pouvoirs rotatoires des peptones pepsiques et pancréatiques pour avoir un moyen facile de diagnose. Malheureusement ces chiffres ne sauraient être fixés d'une façon absolue, parce qu'ils dépendent de la chair musculaire employée et surtout du moment où la digestion est arrêtée.

Suivant qu'on suspend cette digestion un peu avant que cesse toute précipitation azotique, ou un temps plus ou moins long après que celle-ci ne se produit plus, on obtient des produits de pouvoir rotatoire différent et d'autant plus bas qu'on attend plus longtemps.

Comme indication générale, nous dirons seulement que les peptones pepsiques médicinales possèdent un pouvoir rotatoire oscillant autour de -50° et les peptones pancréatiques un pouvoir rotatoire voisin de -40° ou inférieur.

Il faut donc rechercher une autre méthode qui puisse remplacer l'examen polarimétrique ou du moins s'adjoindre à lui. M. HARLAY a trouvé cette autre méthode dans l'emploi de la tyrosinase.

Nous avons déjà dit comment ce réactif biologique permet de caractériser la tyrosine par la formation d'une coloration rouge puis brun noir. Or la tyrosine n'est présente que dans les peptones pancréatiques ; les peptones pepsiques médicinales, qui résultent de digestions peu prolongées, n'en renferment pas.

Pour reconnaître si une peptone medicinale est pepsique ou pancréatique, on en fera une solution, qu'on neutralisera par addition d'acide acétique en léger excès, puis de carbo-

nate de chaux, si elle est alcaline ; — par le carbonate de chaux si elle est acide). On l'additionnera de quelques gouttes de macération glycinée d'une *Russule* riche en tyrosinase. Obtient-on une teinte rouge passant au bout de quelques heures au vert olive, couleur qui vire au rouge par l'ammoniaque et qui redevient verte par l'acide chlorhydrique, on a affaire à une peptone pepsique ; obtient-on une coloration rouge, puis brun noir, que l'ammoniaque ne modifie pas, on a affaire à une peptone pancréatique.

La solution de cette peptone fortement concentrée par évaporation montrera au microscope des cristaux de leucine et de tyrosine, si elle est d'origine pancréatique.

Enfin la réaction de l'eau de brome, que j'ai déjà mentionnée, trouvera son application professionnelle.

Le Codex de 1908 la mentionne en ces termes : « Pour différencier les peptones pepsiques des peptones pancréatiques, versez de l'eau de brome dans une solution aqueuse de ces peptones : avec les peptones pepsiques, il se produira un précipité jaune, avec les peptones pancréatiques vous obtiendrez une coloration rouge violacé intense, passant au brun par un excès de réactif. »

*
* *

§ 3. *Caractères. — Essai.*

Les peptones ne figurent pas dans toutes les pharmacopées ; elles sont inscrites dans les pharmacopées belge et espagnole. Dans cette dernière, il est prescrit de substituer la peptone tartrato-pepsique à la peptone chlorhydro-pepsique pour la préparation des vins médicinaux.

Les peptones médicinales sont entièrement solubles dans l'eau froide et insolubles dans l'alcool très concentré. Leur solution ne se trouble pas par le chauffage, elle ne précipite ni à chaud ni à froid par addition d'acide azotique officinal, d'acide acétique, chlorhydrique, sulfurique, de ferrocyanure de potassium ; elle précipite au contraire par l'acide métaphosphorique, l'acide phosphotungstique, le tannin, l'acide picrique, le bichlorure

de mercure, l'iodure double de potassium et de mercure. Elle donne la réaction du biuret.

Les peptones sont toutes lévogyres, la grandeur de leur pouvoir rotatoire variant, non seulement avec le ferment qui a servi à les préparer, mais aussi avec la nature de la matière protéique originelle.

Les solutions de peptone moussent ; elles filtrent facilement à chaud. Les peptones sont dialysables.

Analyser une peptone, en faire l'essai est une opération assez délicate. L'essai du Codex vise seulement l'épreuve de la chaleur et l'épreuve nitrique, ainsi que la différenciation des peptones pepsiques et pancréatiques. Il ne vise pas la détermination de la matière protéique utilisée pour la préparation de la peptone. En fait, on utilise souvent dans l'industrie non la viande de bœuf mais la viande de cheval. Il n'y a d'ailleurs pas de bonne raison pour en repousser l'emploi.

Une peptone mal préparée peut renfermer des substances protéiques incomplètement peptonisées, ou au contraire une proportion trop élevée de produits ultimes de décomposition : elle peut être frauduleusement additionnée de dextrine, d'amidon, de matières minérales, de matières sucrées comme le sucre de lait. Voyons comment on en fera l'essai systématique.

On vérifie d'abord si la peptone considérée présente les caractères physiques d'une peptone de bonne qualité : odeur, saveur, solubilité ; on fera l'épreuve de la chaleur et de l'acide nitrique ; ces derniers essais révéleront si la peptonisation a été complète ou non.

On déterminera si la peptone est pepsique ou pancréatique. On se rappellera qu'elles sont d'ailleurs l'une et l'autre officinales. On recherchera les substances étrangères, il est clair qu'il en est un certain nombre que les essais précédents permettront déjà ou de soupçonner ou d'écarter.

Recherche de la gélatine. — On fait une solution au vingtième de la peptone à essayer. On en sature une partie, de sulfate de magnésie en petits cristaux, il se fait un trouble et peu à peu surnagent des flocons blancs et visqueux, s'il y a de la gélatine. Avec la peptone pure la solution reste limpide.

Une autre partie de la solution est concentrée ; par refroidissement, elle se prend en gelée en présence de la gélatine.

Recherche des matières grasses. — On triture un poids donné de peptone avec du sable sec, on épuise le mélange par de l'éther de pétrole. Le liquide éthéré distillé puis évaporé dans une capsule tarée laisse un résidu que l'on pèse.

Recherche de la dextrine. — On fait une solution de peptone au dixième, on ajoute de l'iode ; il se fait une coloration rouge violacée s'il y a de la dextrine.

Recherche de l'amidon. — L'incomplète solubilité de la peptone renfermant de l'amidon attire l'attention, et l'examen microscopique caractérise facilement la fraude.

Glucose et lactose. — C'est M. HUGOUNENQ (1) qui a signalé la falsification des peptones commerciales par le lactose.

Il a eu l'occasion d'analyser des échantillons renfermant jusqu'à 1/3 de sucre de lait. Une telle peptone réduit la liqueur de Fehling, mais une peptone falsifiée par du glucose réduit aussi la liqueur cupro-potassique, et il faut distinguer ces deux falsifications.

On y arrive facilement (2). Le lactose donne une osazone facilement soluble dans l'eau bouillante. La glucosazone est insoluble même à chaud. Le lactose hydrolysé par ébullition, en présence d'un acide étendu, se dédouble en glucose et galactose ; on transforme ces 2 sucres en osazones, la glucosazone est insoluble dans l'eau bouillante, la galactosazone est soluble. on peut les séparer en filtrant bouillant le liquide où l'on a fait la précipitation à l'acétate de phénylhydrazine.

Le lactose donne la réaction de RÜBNER : on sature la liqueur à chaud avec de l'acétate neutre de plomb, on ajoute peu à peu de l'ammoniaque à la liqueur bouillante, le liquide vire au jaune, puis à l'orangé et finalement au rouge.

(1) HUGOUNENQ. — Sur une falsification des peptones commerciales. *J. Ph. Ch.*, [6^e], I, 178, 1895.

(2) HUGOUNENQ, *loc. cit.* et L. RUIZAND. — Sur deux réactions pratiques permettant de différencier le lactose du glucose dans les peptones falsifiées. *J. Ph. Ch.*, 6^e, I, 1895.

Enfin le glucose réduit, tandis que le lactose ne réduit pas l'acétate de cuivre à chaud.

Ces méthodes paraissent suffisantes pour faire l'essai d'une peptone médicinale. On a pourtant proposé d'autres techniques (1), dont quelques-unes, assez compliquées, avaient la prétention de permettre d'apprécier la valeur nutritive d'une peptone. Pourquoi ne dirais-je pas que ces complications me paraissent inutiles et ces prétentions injustifiées. Pour juger de la valeur nutritive d'une peptone, il faudrait que les physiologistes nous aient appris, mieux qu'ils ne l'ont pu faire jusqu'ici, dans quel ordre peuvent se grouper les divers fragments qui proviennent de la démolition des albumines au point de vue de l'assimilation, au point de vue de leur aptitude à entrer dans le cycle des réactions cellulaires qui, à partir d'une albumine étrangère, éditent les albumines spécifiques de nos tissus.

Les auteurs de certaines des méthodes auxquelles je fais allusion isolent des peptones médicinales au moyen de quelques réactifs précipitants, l'alcool, des sels neutres, des portions plus ou moins nombreuses qu'ils pèsent ou dont ils dosent l'azote. Ces essais peuvent se réduire aux suivants :

Détermination de la proportion de substances solubles dans l'alcool.— On prend 2 gr. de la peptone à essayer qu'on dissout dans 10 gr. d'eau : on ajoute à cette solution 100 gr. d'alcool à 95° et on laisse reposer dans un lieu frais pendant 24 heures. On décante alors la solution alcoolique, on lave le résidu à plusieurs reprises avec de l'alcool ; on réunit les liqueurs alcooliques. Le précipité est séché à l'étuve et pesé, les liqueurs alcooliques sont distillées et le résidu qu'elles abandonnent séché et pesé.

Une bonne peptone pepsique doit renfermer environ 70 % de substances précipitables par l'alcool et environ 30 % de substances solubles dans ce véhicule. Cette méthode très sim-

(1) Voir entre autres J. KÖNIG et W. KISCH, *Zur Untersuchung der Handels-peptone*, *Z. f. anal. Ch.*, d'ap. *J. Ph. Ch.* [5^e], XX. 254, 1889, et HEATON et VASING, *Analyse des peptones* d'ap. *J. Ph. Ch.* [5^e], XXV. 549, 1892.

ple, recommandée par M. DENCÉYER (1) permet de reconnaître une peptone pepsique de certaines peptones industrielles préparées sans l'intervention de diastases, uniquement par l'action de liqueurs fortement acides et à une température élevée. Celles-ci, en effet, abandonnent à l'alcool, un taux parfois fort élevé de matière solubles, jusqu'à 60 % de la peptone essayée.

Cette méthode s'inspire surtout de cette idée que les parties solubles dans l'alcool constituées par les produits de dédoublement avancé possèdent une valeur alibile moindre. Or c'est un point qui ne saurait être considéré comme démontré.

Les produits ultimes de l'hydrolyse des protéiques paraissent au contraire, parfaitement capables d'être assimilés et d'entretenir la vie. C'est dans ce sens que plaident de récentes expériences d'E. ABDERHALDEN et P. RONA. Ces savants abandonnent pendant 15 jours à l'autolyse à 37° de la viande, dont ils complètent l'hydrolyse par du suc pancréatique additionné de suc intestinal. Au bout de 3 mois, le liquide obtenu est totalement abiurétique ; il ne précipite plus par le sulfate d'ammoniaque.

Les auteurs donnent alors ce produit comme aliment azoté à un chien qui reçoit en outre une quantité convenable de graisse, d'amidon et de sucre. L'animal ainsi nourri pendant 3 semaines reste en bonne santé et augmente de poids.

Les produits d'hydrolyse profonde des albumines paraissent donc parfaitement utilisables par l'organisme, et susceptibles de reconstituer les albumines propres de l'individu qui les reçoit.

Quoiqu'il en soit on peut compléter l'analyse des peptones médicinales par une dernière série d'essais qui ont pour but la séparation des albumoses des peptones (*sensu stricto*).

Procédé Allen. — Deux grammes de peptone sont dissous dans l'eau ; la solution chauffée ne doit pas précipiter ; si elle donne un précipité (nous avons dit que ce caractère suffirait à la faire rejeter), on recueille ce précipité formé d'albumine et

(1) *Loco citato*.

(2) E. ABDERHALDEN et P. RONA. — Weiterer Beitrag zur Frage nach der Verwertung von tief abgebautem Eiweiss im Organismus des Hundes, *Z. ph. Ch.*, LII, 507, 1907.

de syntonine, et on le pèse. Le liquide filtré est acidifié par l'acide sulfurique, additionné de sulfate de zinc à saturation, les albumoses se précipitent ; on les recueille sur un filtre et les pèse ou mieux on en dose l'azote. Le poids d'azote multiplié par 6,25 donne approximativement le poids d'albumose.

Enfin, dans le liquide filtré et acidulé, on précipite les peptones par l'eau bromée. On filtre sur un tampon de coton de verre, on lave le précipité à l'eau froide et l'on y dose l'azote. On calcule approximativement le chiffre de peptone correspondant en multipliant par 6,25.

..

§ 4. *Conservation. Emploi.*

Les peptones médicinales sont assez altérables ; on doit les conserver dans des vases bien clos à l'abri de la chaleur et de l'humidité.

On les prescrit comme aliments chez les malades qui, pour une raison quelconque, ne peuvent s'alimenter avec de la viande. On les délaye pour l'emploi dans le bouillon, dans du lait ; on en fait la base de préparations diverses.

A titre d'exemple, je cite les formules de vin, sirop et élixir données par M. A. PETIT :

<i>Elixir</i>	<i>Sirop</i>	<i>Vin</i>
Alcool à 95°..... 10 gr.	Eau..... 30 gr.	Vin de Malaga 95
Vin de Frontignan 40 gr.	Sucre..... 60	Peptone..... 5
Sucre..... 25	Peptone... .. 5	
Eau..... 20	Teinture d'é-	
Peptone..... 5	corces d'oran-	
	ges..... 5	

On l'administre aussi sous forme de lavements nutritifs, quand l'alimentation par la voie normale est impossible ou insuffisante. Pour la préparation des médicaments magistraux à base de peptone, les pharmaciens utilisent des peptones liquides. Ce ne sont autre chose que les liquides de digestion de la viande préparés comme pour la fabrication des peptones sèches, mais dont l'évaporation a été arrêtée de façon que

la solution renferme 50 % de peptone. Ces solutions étant très altérables, on les additionne généralement de 1/5 de glycérine et de la même quantité d'alcool.

M. DENËYER (1) a fait connaître, sous le nom d'*albumoses thérapeutiques*, des médicaments qui résultent de la digestion peptique des organes habituellement utilisés dans la médication opothérapique (glande thyroïde, testicule, ovaire, rate, etc.). On utilise de même en opothérapie des extraits pancréatiques d'organes, (CATILZON, CARNOT et CHOAY).

Sous le nom de *peptonates* on désigne des médicaments dans lesquels la peptone est associée à divers sels métalliques et où les métaux ont leurs réactions spécifiques plus ou moins masquées.

Le Codex de 1908 formule une solution de peptonate de mercure. Il fait préparer de toutes pièces une peptone pepsique d'ovalbumine.

Blanc d'œuf.....	n° 1
Pepsine.....	0,25
HCl dilué.....	6
Bicarbonate de soude.....	Q. S.
Chlorure mercurique.....	5
Chlorure de sodium officinal.....	2,50
Eau distillée.....	500

Délayez le blanc d'œuf dans 300 grammes d'eau. Dissolvez la pepsine dans la même quantité d'eau, ajoutez l'acide chlorhydrique dilué ; mélangez et maintenez le tout à +50° jusqu'à peptonisation complète. Laissez refroidir puis neutralisez le liquide avec Q. S. de bicarbonate de soude.

D'autre part, dissolvez, à l'aide du chlorure de sodium, le chlorure mercurique dans le reste de l'eau filtrée ; versez peu à peu en mélangeant avec soin cette solution dans celle de peptone. Laissez en contact pendant 24 heures en agitant de temps en temps. Complétez avec de l'eau distillée le volume à 500 c³ ; filtrez de manière à obtenir un liquide parfaitement limpide.

Un *centimètre cube* de soluté de peptonate de mercure correspond à un *centigramme* de chlorure mercurique.

M. PETIT avait jadis donné les formules suivantes :

Bichlorure de mercure,..	1
Chlorure de sodium.....	2
Peptone sèche.....	1

(1) Congrès de Pharmacie de Bruxelles 1897.

Dissoudre dans la plus petite quantité d'eau possible. Filtrer, évaporer dans le vide. Le produit bien desséché est trituré de nouveau. Il se dissout sans résidu dans l'eau. On prépare une solution pour injection hypodermique avec :

Peptone mercurique.....	4
Eau distillée.....	100

La peptone mercurielle DELPECH était ainsi composée :

Peptone en poudre.....	9
Chlorure d'ammonium.....	9
Bichlorure de mercure.....	6

Dissoudre dans 24 grammes d'eau distillée, filtrer, ajouter 72 grammes de glycérine. 5 gr. = 0,25 HgCl².

Solution pour injection hypodermique :

Peptone mercurio-ammonique ...	0,50
Eau	25
Glycérine.....	5

Solution pour l'usage externe :

Peptone mercurio-ammonique.....	1
Glycérine pure.....	50
Eau.....	200

On utilise ainsi en thérapeutique des peptonates de fer dont on a multiplié les procédés de préparation. Voici, par exemple, celle du peptonate de fer ammoniacal de JAILLET et QUILLARD :

Faire séparément les deux solutions :

Peptone sèche.....	5	Chlorure d'ammonium....	5
Eau.....	50	Eau.....	50

Verser dans la solution de peptone 12 grammes de solution officinale de perchlorure de fer chimiquement neutre ; il se forme un coagulum que l'on redissout en ajoutant la solution de chlorure d'ammonium. On verse enfin : glycérine 75 grammes et eau Q. S., pour obtenir 200 c³ de mélange, qu'on rend légèrement alcalin par addition de quelques gouttes d'ammoniaque. Après filtration, on possède une solution de peptonate de fer parfaitement dialysable qui représente par centimètre cube 5 milligrammes de fer.

M. JUNGCLAUSSEN (1) prépare un peptonate de fer et de manganèse.

(1) JUNGCLAUSSEN. — Verfahren zur Herstellung eines Eisenmangan peptonats. *Apoth. Ztg.*, XVII, 755.

La peptone sert aussi à la préparation de médicaments iodés (*iodopeptone* ou *peptone-iode*) où l'iode est à l'état dissimulé.

L'iodopeptone se présente sous forme de paillettes jaunes, solubles dans l'eau, la glycérine, l'alcool faible. Elle renferme 16,5 % d'iode. Elle paraît constituer un bon médicament iodé.

Enfin dans le commerce pharmaceutique sont répandus sous des noms variés des produits dont la valeur alimentaire et thérapeutique serait très supérieure, au dire des fabricants, à celle des peptones médicinales. La plupart d'entre ces produits viennent d'Allemagne. Citons la *Somatose*, qui s'obtient en chauffant de la viande à 105° avec de l'acide oxalique ; celui-ci est ensuite éliminé avec de la chaux. Ce produit est un mélange de syntonine et d'albumoses, avec très peu de peptone proprement dite. On la prépare aussi avec la caséine.

La *nutrose* est un sel sodique, et l'*eucasine* un sel ammoniacal de caséine ; la *sanose* est un mélange de caséine et d'albumose. La *plasmone* est aussi du caséinate de soude. Mais on voit que ces produits n'ont rien de commun avec les peptones officinales ; il suffit de les avoir signalés.

Je signale aussi brièvement les peptones de levures obtenues par l'action des ferments protéolytiques sur la levure (M. PEETERS, de Schœrbeck) et les produits obtenus par action d'acides organiques (oxalique ou tartrique) à haute température (100°-105°) sur la levure ; le *Sitogène* est le type de ces derniers médicaments.

On a préconisé la substitution aux peptones de viande de peptones naturelles d'origine végétale, telle la peptone d'amande (E. LEMPORT).

CHAPITRE IV.

EREPSINE.

Sous le nom d'*Erepsine*, COHNHEIM (1) désigne un ferment soluble qu'il a trouvé dans la muqueuse de l'intestin grêle des Mammifères et qui digère les albumoses et les peptones en les transformant en acides aminés (2).

SALVIOLI en 1880, HOFMEISTER en 1881, avaient observé que la peptone maintenue, *in vitro*, au contact des parois intestinales fraîches, disparaît rapidement.

Les physiologistes en avaient conclu que la peptone est transformée en albumine, soit par les organes lymphoïdes (HOFMEISTER), soit par les cellules épithéliales (HEIDENHAIN, SHORE). D'autres faits dus à HOFMEISTER et à NEUMEISTER, entre autres l'absence de peptone dans les tissus, le sang, la lymphe, même chez des animaux en pleine digestion, avaient fortifié cette idée de la régression dans la muqueuse intestinale des peptones en albumines.

En 1901, COHNHEIM montre qu'en effet la peptone disparaît au contact de la muqueuse intestinale, mais non pas par suite d'une transformation en albumine, par suite, au contraire, d'un dédoublement avec production de tyrosine et de leucine.

L'agent de dédoublement est une diastase: l'*Erepsine* (de *ἑρπίσω*, je détruis).

(1) OTTO COHNHEIM. — Die Umwandlung des Eiweiss durch die Darmwand. *Z. ph. Ch.*, XXXIII, 451, 1901.

(2) Il ne sera question ici que de l'*Erepsine* intestinale. Les diastases que, sous le même nom ou des noms différents, l'on rapproche de l'*Erepsine* intestinale seront mentionnées à propos des diastases protéolytiques des organes ou des plantes.

§ 1. *Extraction du ferment. Localisation.*

On prélève l'intestin grêle d'un chien que l'on vient de sacrifier, on le lave sous un courant d'eau. La muqueuse est enlevée par raclage, broyée avec du sable et mise à macérer pendant quelques heures avec une solution physiologique de chlorure de sodium légèrement alcaline. On exprime à la presse. Cette liqueur filtrée peut directement servir aux expériences.

Pour en extraire le ferment, COHNHEIM (1) applique la méthode de JACOBY, basée sur la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammoniaque.

A l'extrait de muqueuse intestinale, on ajoute une solution concentrée de sulfate d'ammoniaque (3 parties de solution pour 2 d'extrait). Il se fait un volumineux précipité qui est recueilli par filtration, mis en suspension dans l'eau et dialysé.

Le ferment est dissous en même temps qu'une petite quantité de substance protéique. Une nouvelle extraction faite avec le résidu insoluble permet d'augmenter notablement le rendement en diastase.

On obtient ainsi le ferment sous forme d'une solution privée de sulfate d'ammoniaque, légèrement albumineuse et un peu opalescente.

RAUBITSCHER (1) donne la méthode de préparation suivante : la muqueuse prélevée comme précédemment est réduite en bouillie en présence d'eau physiologique, pulpée à travers un tamis, étendue en couche mince sur une plaque de verre et séchée à 34-40° pendant 24 heures. La masse pulvérisée est lixiviée à froid avec du toluène et de l'acétone et de nouveau séchée.

Cette poudre reste active pendant plusieurs mois.

D'après LAMBERT (2), la muqueuse intestinale maintenue dans l'alcool conserve sa richesse en érepsine et, desséchée, elle

(1) COHNHEIM. — *Loc. cit.*, p. 457.

(2) RAUBITSCHER. — *Erfahrungen über das Erepsin. Z. für exp. Path. u. Ther.*, IV, 674, 1907.

(3) LAMBERT. — *Sur la fermentation érepsique. C. R. Biologie*, LV, 416, 1903.

peut supporter sans inconvénient une température de 105° pendant 2 heures.

L'érepsine a été trouvée dans la muqueuse de l'intestin grêle de divers Mammifères et Oiseaux : bœuf, cheval, brebis, cobaye, lapin, poulet, oie... d'après BERGMANN (1). Il y en aurait aussi en petite quantité dans la muqueuse stomacale BERGMANN.

L'érepsine est présente dans le suc intestinal. S. SALASKIN (2) l'a caractérisée dans le suc intestinal du chien recueilli par le procédé de THIRY-VELLA.

KUTSCHER et SEEMANN (3) ont fait la même observation. J.-H. HAMBURGER et HEKMA (4) l'ont trouvée dans le suc intestinal de l'homme. Le suc intestinal peut donc être utilisé pour l'étude de l'érepsine. Mais il se montre généralement d'une activité plus faible que les extraits de COHNHEIM.

L'érepsine n'est pas uniformément répandue dans l'intestin grêle.

Contrairement aux autres ferments intestinaux, amylase, invertine, maltase, elle est un peu plus abondante dans le jéjunum que dans le duodénum.

D'après FALLOISE (5), elle est élaborée non par les organes lymphoïdes de l'intestin, mais à la fois par les cellules des villosités et par celles des glandes de LIEBERKÜHN.

Elle ne résulte pas de la transformation d'un proferment en ferment par intervention d'un agent approprié qu'on aurait pu croire, à la suite d'expériences d'EMDEN et KNOOP (5), apporté

(3) BERGMANN. — Studien über die Digestion der Pflanzenfresser. *Skand. Arch. f. Physiol.*, XVIII, 119, 1906, d'ap. *Bioch. Ctb.*, V, 120, 1906.

(1) S. SALASKIN. — Über das Vorkommen des Albumosen, resp. Peptone spaltenden Fermentes (Erepsin von Cohnheim) im reinem Darmsafte von Hunden. *Z. ph. Ch.*, XXXV, 419, 1902.

(2) KUTSCHER et SEEMANN. — Zur Kenntniss der Verdauungsvorgänge im Dünndarm. *Z. ph. Ch.*, XXXV, 432, 1902.

(3) HAMBURGER et HEKMA. — On the intestinal juice of Man. *Kon. Akad. v. Wetenschappen te Amsterdam*, 733, 1902 et : Sur le suc intestinal de l'homme. *J. de Phys. et de Path. gén.*, IV, 805, 1902.

(4) FALLOISE. — Distribution et origine des ferments digestifs de l'intestin grêle. *Arch. int. de Physiol.*, II, 299, 1905.

(5) EMDEN et KNOOP. — Über das Verhalten der Albumosen in der Darmwand, und über das Vorkommen von Albumosen im Blut. *Hofm. Beitr.*, III, 120, 1902.

par le suc pancréatique. WECKERS (2), puis COHNHEIM (3) ont établi que la ligature des conduits pancréatiques chez un chien, ou l'ablation du pancréas ne suppriment pas la sécrétion de l'érepsine par la muqueuse intestinale.

* *

§ 2. Action de l'érepsine. Conditions d'activité.

L'érepsine est active en milieu neutre ou très légèrement alcalin, elle n'agit pas en milieu acide (COHNHEIM (4) ou en milieu franchement alcalin (WEINLAND (5)). Sa température optima est voisine de 30°; elle est détruite par 2 heures de chauffage à 63° (COHNHEIM) (4).

L'érepsine digère les albumoses et les peptones. Elle les transforme en produits abiurétiques et de manière si profonde que son action est tout à fait comparable à celle des acides forts.

O. COHNHEIM (6) a étudié l'action du ferment sur les diverses fractions d'albumoses et sur les peptones que l'on peut isoler de la peptone de WITTE ou d'un liquide de digestion pepsique.

La peptone pepsique (au sens de KÜHNE), les deutéro-albumoses, la proto-albumose sont rapidement décomposées jusqu'à disparition complète de la réaction du biuret. L'hétéro-albumose résiste beaucoup plus longtemps; dans une expérience de COHNHEIM, l'érepsine n'avait pas, après 4 semaines, transformé entièrement en produits abiurétiques une hétéro-

(1) L. WECKERS. — Contribution à l'étude de l'érepsine. *Arch. int. de Physiol.*, II, 49, 1905.

(2) O. COHNHEIM. — Notiz über das Erepsin. *Z. ph. Ch.*, XLVII, 286, 1906.

(3) O. COHNHEIM. — *Loc. cit.* et Weitere Mittheilungen über das Erepsin. *Z. ph. Ch.*, XXXV, 134, 1902.

(4) WEINLAND. — Notiz betreffend die proteolytische Wirkung von Darmextrakten und den Einfluss der Reaktion auf dieselbe. *Z. f. Biol.*, XLV, 293, 1903.

(5) *Loc. cit.* et Zur Spaltung des Nahrungseiweisses im Darm. *Z. ph. Ch.*, XLIX, 64, 1906. — LI, 415, 1907.

albumose de myosine et une hétéro-albumose de fibrine. La peptone trypsique (antipeptone) est également attaquée, mais avec lenteur.

Les produits de la réaction diastasique sont, en nature et en proportion, tout à fait semblables à ceux que fournirait l'hydrolyse acide. COHNHEIM a étudié les produits de digestion pepsique, puis érepsique d'une syntonine dont HART avait fait l'hydrolyse acide. Il dose l'azote facilement libérable à l'état d'ammoniaque par la magnésie. Il trouve 7,2 % (7,13 % dans l'hydrolyse acide). Il dose l'azote précipitable par l'acide phosphotungstique et trouve 29,9 %, soit un chiffre légèrement supérieur à celui que donne l'hydrolyse acide 27,14 %. Du précipité phosphotungstique il isole les bases hexoniques, arginine, histidine, lysine. Parmi les corps non précipitables par l'acide phosphotungstique, il isole la tyrosine et la leucine représentant respectivement 7,9 % et 10,73 % de l'azote total, chiffres entièrement concordants avec ceux de l'hydrolyse acide.

La production de la tyrosine au cours de la digestion érepsique peut être facilement mise en évidence par l'emploi de la tyrosinase. On voit que ce réactif ne constitue pas un réactif spécifique de la réaction trypsique, puisqu'il s'applique à toute hydrolyse diastasique au cours de laquelle la tyrosine est susceptible d'apparaître.

L'érepsine n'attaque pas les substances protéiques proprement dites. Elle ne digère pas : les albumines du plasma de cheval, les albumines d'un liquide d'ascite humaine, la vitelline, la globine retirée de l'hémoglobine du cheval, la viande de bœuf, une albumine végétale retirée des semences de courge, l'albumine de BENGE-JONES. Toutefois elle digère très facilement et très rapidement la caséine : en 2 ou 3 jours, elle en libère la tyrosine et, en 2 ou 3 semaines, la transforme entièrement en produits abiurétiques; elle décompose la clupéine, mettant très rapidement en liberté de l'arginine (1). COHNHEIM laissant pourtant des protones inattaquées après plusieurs mois (A. KOSSEL et DAKIN) (1). L'érepsine décompose lente-

(1) A. KOSSEL et DAKIN.— Ueber Arginase. *Z. ph. Ch.* XLI, 321, 1904.

ment l'histone du thymus (O. COHNHEIM) ; elle attaque ainsi l'acide nucléique de *Muraenosox cinereus Forsk* (NAKAYAMA) (2).

L'érepsine hydrolyse des peptides que la trypsine n'attaque pas.

ABDERHALDEN et TERUUCHI (3) ont observé que le suc intestinal du chien recueilli d'une anse isolée du jéjunum et absolument exempt de suc pancréatique, dédouble la glycyl-glycine et la glycyl-l-tyrosine, peptides sur lesquels, nous l'avons vu, la trypsine reste sans action. HANS EULER (4) a étudié la marche du dédoublement de la glycyl-glycine par l'érepsine du porc en observant les variations de la conductibilité électrique. Le dédoublement est favorisé par les alcalis sous une très faible concentration. Sa rapidité est peu influencée par la quantité de peptide ; elle est proportionnelle à la concentration de la diastase.

L'analogie de constitution qui existe entre les peptides et l'acide hippurique permettrait de penser que l'érepsine, si active vis-à-vis des premiers, dédoublerait aussi le second. Mais ce dédoublement ne se produit pas (O. COHNHEIM) (2).

*
* *

§ 3. Spécificité.

L'importance du rôle physiologique de l'érepsine a été mise en doute et sa spécificité même discutée (3).

Il ne saurait être question de développer ici le premier

(1) M. NAKAYAMA. — Ueber das Erepsin. *Z. ph. Ch.* XLI, 348, 1904.

(2) E. ABDERHALDEN et TERUUCHI. — Studien über die proteolytische Wirkung der Presssäfte einiger thierischer Organe sowie des Darmsaftes. *Z. ph. Ch.*, XLIX, 1, 1906.

(3) HANS EULER. — Fermentative Spaltung von Dipeptiden. *Z. ph. Ch.*, LI, 213, 1907.

(4) O. COHNHEIM. — Das Verhalten der Hippursäure zu Erepsin. *Z. ph. Ch.*, LII, 526, 1907.

(5) Voir entre autres KUTSCHER et SEEMANN, *loc. cit.* *Z. ph. Ch.*, XXXV, 432, 1902, et : Beitrag zur Kenntniss der Verdauung im Dünndarm. *Z. ph. Ch.* XLIX, 298, 1906.

O. COHNHEIM. — Trypsin u. Erepsin. *Z. ph. Ch.* XXXVI, 13, 1902.

point. En ce qui concerne la spécificité de ce ferment soluble, il me semble qu'elle est établie sur de bons arguments. Sa distinction d'avec l'entéro-kinase est évidente, sa distinction d'avec la trypsine est basée sur son inactivité vis-à-vis des albumines proprement dites, sur la décomposition profonde qu'elle fait subir aux peptones. Si ce dernier fait a pu être mis en discussion, il semble bien que le dédoublement par l'érepsine des peptides que la trypsine n'attaque pas tranche le débat en faveur de la spécificité de cette diastase. Enfin il n'est pas sans intérêt d'insister sur ce fait que l'érepsine décompose la caséine, qu'elle est par conséquent ou qu'elle est associée à une caséase ; c'est une notion que nous retrouverons.

CHAPITRE V.

FERMENTS PROTÉINOLYTIQUES

des tissus et organes.

Les diastases que nous avons étudiées jusqu'ici exercent leur action en dehors des cellules qui les ont sécrétées (1), elles représentent les agents actifs de dédoublement des substances protéiques des sucs gastrique, pancréatique, entérique ; ce sont essentiellement des diastases « digestives » concourant à la transformation des albumines alimentaires en substances « assimilables ». Mais les phénomènes de protéolyse ne se bornent pas à ceux qui ont pour siège le tube digestif.

Il semble bien que chez l'animal vivant la transformation que subissent les matières protéiques dans toutes les cellules des organes soient également le fait de diastases, si bien qu'après avoir étudié les diastases protéolytiques digestives nous sommes conduits à étudier les diastases protéolytiques des organes, c'est-à-dire les agents de dédoublement des substances protéiques purement endo-cellulaires.

On comprend aisément qu'il n'est pas aisé d'aborder une pareille étude par la méthode expérimentale. Aussi est-ce seulement par une extension, sur la légitimité de laquelle il faut se montrer très réservé, que nous connaissons ces protéases endo-cellulaires. C'est en effet sur des organes morts conservés

(1) Il faut pourtant observer que l'érepsine est surtout une diastase endocellulaire et que sa présence dans le suc entérique, que nous avons admise avec SALASKIN, KUTSCHER, etc., ne doit l'être sans doute que provisoirement. (Communication orale de M. FROUIN).

aseptiquement, en voie « d'autolyse », qu'on a observé ces phénomènes de protéolyse.

On s'est même parfois hâté de conclure à une action diastasique sans apporter une preuve expérimentale suffisante de l'origine diastasique de la réaction observée. Aussi ce groupe de diastases ne se prête-t-il encore qu'à une mise au point un peu confuse. Il se présente pourtant avec plus de netteté lorsque l'on considère les ferments des « nucléo-protéïdes », ceux du moins, comme la nucléase qui agissent sur la partie nucléique des protéïdes.

Nous trouverons enfin dans l'arginase, — que l'on ne saurait séparer des ferments protéolytiques, — une diastase parfaitement caractérisée et dont le mode d'action pourra s'exprimer par une formule chimique simple.

Si les ferments qui font l'objet de ce chapitre intéressent surtout le physiologiste, le pharmacologue ne saurait les ignorer à l'heure où, les organes des animaux, par un singulier retour des choses, reprenant dans la thérapeutique une place importante, les extraits et poudres d'organes s'inscrivent dans les pharmacopées.



A SCHÜTZENBERGER revient le mérite d'avoir observé le premier la transformation intracellulaire de substances protéïques en corps plus simples, en leucine et tyrosine. Les observations de ce savant portent sur la levure de bière maintenue humide et à jeun pendant 12 à 15 heures à 35° - 40° C. Il constate que dans ces conditions la levure « agit d'une manière progressive sur ses éléments constitutifs insolubles et les convertit en principes solubles ». « Ce phénomène, ajoute-t-il, est la conséquence d'une *action physiologique exercée par la levure sur sa propre substance, et non d'une putréfaction* (1). » Et plus tard il assimile entièrement ces phénomènes à des processus de digestion et généralisant sa pensée, il ajoute : « Il en est de

(1) P. SCHÜTZENBERGER. — Recherches sur la levure de bière. *Bull. Soc. Chim.*, XXI, 204, 1874.

même des transformations chimiques continues qui se passent dans le protoplasma des cellules végétales et animales (1). »

SALKOWSKI (2) reprend les expériences de SCHÜTZENBERGER ; dans l'eau chloroformée, c'est-à-dire en milieu antiseptique, la levure inanitiée, non chauffée, produit de la leucine et de la tyrosine aux dépens de ses protéides, comme elle produit de l'anhydride carbonique, de l'alcool, un sucre réducteur, aux dépens de ses hydrates de carbone.

Il rapporte ces phénomènes d'autofermentation à l'action de diastases, les conditions expérimentales excluant toute intervention microbienne.

Il fait des observations de même ordre avec les organes des animaux, le foie, les muscles, et soutient l'existence générale de ferments endocellulaires (3).

SCHWIENING (4) puis BIONDI (5) confirment les travaux de SALKOWSKI. SCHWIENING montre que dans un macéré d'organes filtré, entièrement privé de débris cellulaires, les transformations se poursuivent identiques à celles que présentent les bouillies d'organes ; c'est donc bien à des ferments solubles que doivent être rapportés les phénomènes chimiques de l'autolyse.

JACOBY (6), à qui l'on doit d'importants travaux sur l'autolyse, tente le premier d'extraire un ferment soluble d'un extrait d'organe.

Un foie de chien est abandonné à l'autolyse pendant 14 jours en milieu antiseptique (eau toluolée). Le macéré saturé de sulfate d'ammoniaque abandonne un précipité qui se montre actif sur les matières protéiques du foie.

(1) P. SCHÜTZENBERGER. — Les Fermentations, 252, 1884.

(2) E. SALKOWSKI. — Zuckerbildung und andere Fermentation in der Hefe. *Z. ph. Ch.*, XIII, 506, 1898.

(3) E. SALKOWSKI. — Über Autodigestion der Organe. *Z. Klin. Med. Suppl.*, XVII, 77, 1890.

(4) SCHWIENING. — Ueber fermentative Prozesse in den Organen, *Virch. Arch.*, CXXXVI, 444, 1894.

(5) BIONDI. — Beiträge zur Lehre der fermentativen Prozesse in den Organen. *Virch. Arch.*, CXLIV, 373, 1896.

(6) JACOBY. — Ueber die fermentative Eiweisspaltung und Ammoniakbildung in der Leber. *Z. ph. Ch.*, XXX, 149, 1900.

Les recherches de Jacoby, dont le détail ne saurait rentrer dans le cadre de ce mémoire, mettent en lumière l'importance des ferments endocellulaires : elles donnent à penser que, bien qu'insaisissable pendant la vie, l'action de ces ferments préside au métabolisme de matière dont chaque cellule est le siège.

L'intérêt, pour la physiologie et la pathologie d'une telle question, suscite un nombre important de travaux. On rencontre des protéases dans tous les organes : la rate (HEDIN et ROWLAND (1), LEATHES (2), CATHCART (3), le thymus (KUTSCHER) (4), le foie (HEDIN et ROWLAND (5), LEVENE et STOOKEY (6), BERGELL et LEWIN (7), etc.), le pancréas (LEVENE (8), KUTSCHER et LOHMANN (9), les reins (HEDIN et ROWLAND (10), DAKIN (11), le placenta (BERGELL et LIPPMANN (12), SAVARÉ) (13), les leucocytes (MÜLLER et JOCHMANN (14),

(1) HEDIN et ROWLAND. — Über ein proteolytisches Enzym in der Milz. *Z. ph. Ch.*, XXXII, 341, 1901.

HEDIN. — Investigations on the proteolytic enzymes of the spleen of the ox. *J. of Physiol.*, XXX, 155, 1903.

(2) LEATHES. — On the products of the proteolytic action of an enzyme contained in the cells of the splein. *J. of Physiol.*, XXVIII, 360, 1902.

(3) CATHCART. — Proteolytic products of the splenic enzyme acting in an alkaline medium. *J. of Physiol.*, XXXII, 299, 1905.

(4) KUTSCHER. — Das proteolytische Enzym des Thymus. *Z. ph. Ch.*, XXXIV, 114, 1901.

(5) HEDIN et ROWLAND. — Untersuchungen über das Vorkommen von proteolytischen Enzymen im Thierkörper. *Z. ph. Ch.*, XXXII, 531, 1901.

(6) LEVENE et STOOKEY. — On the combined action of proteolytic enzymes. *Amer. J. of Physiol.*, XII, 1, 1904.

(7) BERGELL et LEWIN. — Ueber den Abbau der Eiweisskörper im Organismus. *Z. f. exp. Path.*, III, 125, 1906.

(8) LEVENE. — Die Endprodukte der Selbstverdauung tierischer Organe. *Z. ph. Ch.*, XLI, 393, 1904.

(9) KUTSCHER et LOHMANN. — Die Endprodukte der Pankreasverdauung. *Z. ph. Ch.*, XLIV, 381, 1905.

(10) *Loc. cit.*

(11) DAKIN. — The products of the proteolytic action of an enzyme contained in the cells of the Kidney. *J. of Physiol.*, XXX, 84, 1903.

(12) BERGELL et LIPPMANN. — Über die in der Placenta enthaltenen Fermente. *Munch. med. Woch.*, LII, 2241, 1905.

(13) SAVARÉ. — Zur Kenntniss der Fermente der Placenta. *Hofm. Beitr.*, IX, 141, 1907.

(14) MÜLLER et JOCHMANN. — Ueber eine einfache Methode zum Nachweis proteolytischer Fermentwirkungen. *Munch. med. Woch.*, LIII,

EPPENSTEIN (1), SFEIFFER (2), ERBEN (3), OPIE (4), la moelle osseuse OPIE (5) l'utérus perpuéral (FERRONI (6), les tumeurs cancéreuses (PETRY, BLUMENTHAL (7), etc.

Tous les faits accumulés ne permettent pourtant pas encore de présenter une histoire didactique de ces protéases. Tout au plus puis-je, de cet ensemble, tirer quelques faits généraux.

Le premier fait paraît être la multiplicité de ces ferments protéolytiques endocellulaires. Les protéases qui agissent dans l'autolyse du foie, du rein, de la rate d'une espèce animale donnée ne sont pas identiques ; dans quelques cas, on a même pu isoler d'un même organe plusieurs protéases dont l'activité est commandée par des conditions différentes.

Ainsi de la rate du bœuf HEDIN a isolé 2 diastases, une liéno- α -protéase active en milieu alcalin et une β protéase active en milieu acide.

Le deuxième fait général a trait à leur spécificité. J'entends par là qu'une protéase donnée agit le plus activement sur les albumines mêmes de l'organisme d'où elle provient — spécificité d'ailleurs toute relative, car elle peut aussi, bien que plus lentement, dédoubler des albumines étrangères. C'est ainsi que la protéase du foie est inactive sur les albumines des muscles

1393, 1906. Über proteolytische Fermentwirk. der Leukocyten, id., 1507, 1906. Weitere Ergebnisse unserer Methode zum Nachweis proteolytischer Fermentwirk., id. 2002, 1906, etc.

(1) EPPENSTEIN. — Über das proteolytische Ferment der Leukocyten, insbesondere bei der Leukämie, und die hemmende Wirkung des Blutserums. *Münch. med. Woch.*, 2192, 1906.

(2) PFEIFFER. — Über Autolyse leukämischen und leukozytischen Blutes. *Wien. Klin. Woch.*, XIX, 1249, 1906.

(3) ERBEN. — Über das proteolytische Ferment der Leukocyten und die Autolyse normalen Menschenblutes. *Münch. med. Woch.*, LIII, 2567, 1906.

(4) OPIE. — Fermente und Antifermente in entzündlichen Exsudaten. *J. of exp. Med.*, VII, 316, 1905 ; VIII, 536, 1906.

OPIE et BARKER. — Leucoprotease and antileucoprotease of Mammals and of Birds. *J. of exp. Med.*, VIII, 207, 1907.

(5) OPIE. — The presence in the bone-marrow of enzyme resembling those of leucocytes. *J. of exp. Med.*, VII, 759, 1905.

(6) FERRONI. — Sull' autolisi dell' utero puerperale, d'ap. *Bioch. Cth.*,

(7) Cités d'ap. GLEX. Physiologie. 662, 1907.

V, 788, 1906.

RICHET) mais dédouble la caséine du lait (LEVENE et STOOKEY).

Les protéases des organes sont le plus souvent actives dans un milieu légèrement acide : l'acidité lactique paraît être la plus favorable. Le cas n'est pourtant pas général. L'α protéase de la rate agit en milieu alcalin HEBIN : la leucoprotéase des leucocytes polynucléaires est active en milieu alcalin tandis que la leucoprotéase des mononucléaires est active en milieu acide (OPIE).

Ces diastases trouvent, dans les divers sels, des agents favorisants (sels alcalino-terreux pour la protéase du foie et des agents inhibiteurs (citrate de soude) (LAUNOY) (1).

Les protéases de l'autolyse poussent très loin la décomposition des protéiques. Elles donnent naissance à toute la série d'acides aminés et de bases hexoniques que fournit la trypsine pancréatique ; sans doute aussi si du moins les auteurs se sont bien mis à l'abri des microbes, ce qui est parfois très contestable à une notable proportion d'ammoniaque et à des corps dérivés d'acides aminés par perte de CO² comme la cadavérine WÉRIGO (2). Elles donnent aussi des corps intermédiaires entre les substances protéiques et les produits les plus simples d'hydrolyse, des albumoses comme JACOBY en a trouvé dans l'autodigestion des poumons et DRJEWZKI (3) dans celle du foie.

*
* *

À côté des endoprotéases agissant sur les substances protéiques proprement dites, on rencontre dans les tissus ou organes, un ferment agissant seulement sur leurs premiers produits de dédoublement, albumoses et peptones.

C'est une diastase analogue ou identique à l'érepsine, trouvée

(1) LAUNOY. — L'autolyse des organes et les ferments endocellulaires. *Bull. Inst. Pasteur*, VI, 15 et 30 avril 1908. La bibliographie qui accompagne cette excellente revue nous a rendu service pour la rédaction de ce chapitre.

(2) WÉRIGO. — Über das Vorkommen des Pentamethylendiamins in Pankreasinfusen. *Pflüg. Arch.*, LI, 362, 1892.

(3) DRJEWZKI. — Über den Einfluss der alkalischen Reaktion auf die autolytischen Vorgänge in der Leber. *Bioch. Zeit.*, I, 229, 1906.

par COHNHEIM dans la muqueuse intestinale et le suc entérique. VERNON (1) a trouvé une érepsine dans le pancréas et le foie. Pour lui, cette érepsine est différente de l'érepsine intestinale, son action s'exerce exclusivement en milieu alcalin (0,4 à 1,2 % en CO^3Na^2) ; elle est extrêmement lente.

Il rencontre dans le rein, le pancréas, le foie, la rate, le cœur, les muscles, le cerveau des animaux les plus divers (chat, lapin, cobaye, pigeon, grenouille, anguille, homard, moule d'eau douce), des érepsines, différant les unes des autres par leur plus ou moins grande sensibilité à l'alcalinité ou à l'acidité.

Il étudie comment varie cette diastase au cours du développement fœtal, comment elle varie avec l'âge, avec les maladies, etc., et il donne la mesure du pouvoir érepsique comme susceptible de renseigner sur l'activité fonctionnelle des organes.

BERGMANN (2) trouve l'érepsine dans la muqueuse intestinale des herbivores, SAVARÉ (3), dans le placenta humain, FALLOISE (4), dans l'hépatopancréas des Céphalopodes. Cette diastase joue assurément un rôle important dans l'autolyse des organes.

On ne peut s'empêcher de trouver bien fragiles les distinctions établies par les physiologistes entre tous ces agents de protéolyse cellulaire, distinctions d'autant plus sujettes à caution que dans la majorité des cas les auteurs ont étudié soit les organes broyés, soit les « sucs de presse ». Le chimiste se

(1) VERNON. — The peptone-splitting ferments of the pancreas and intestine. *J. of physiol.*, XXX, 330, 1903. — The universal presence of erepsin in animal tissues. *Id.*, XXXII, 33, 1904. — The ereptic power of tissues as a measure of functional capacity. *Id.*, XXXIII, 81, 1905. Das Vorkommen von Erepsin im Pankreas. *Z. ph. Ch.*, L, 440, 1907. Voir polémique avec MAYS. *Z. ph. Ch.*, XLIX, 124 et LI, 182, 1907.

(2) BERGMANN. — Studien über die Digestion der Pflanzenfresser. *Skand. Ark.*, XVIII, 119, 1906.

(3) SAVARÉ. — Zur Kenntniss der Fermente der Placenta. *Hofm. Beitr.*, IX, 141, 1907.

(4) FALLOISE. — Contribution à la physiologie comparée de la digestion. La digestion chez les Céphalopodes. *Arch. int. de Physiologie*, III, 282, 1906.

trouve un peu embarrassé pour classer tous ces ferments en connaissance de cause.

La méthode d'ABDERHALDEN qui consiste, on s'en souvient, à faire agir les liquides diastatiques sur les polypeptides optiquement actifs est peut-être susceptible d'apporter quelque lumière dans le débat. ABDERHALDEN, avec de nombreux collaborateurs, a étudié, à ce point de vue, l'action de divers sucs d'organes :

Avec Tervuchi (1), ceux de foie et de muscle de bœuf, de muscle, rein et foie de chien ;

Avec Hunter (2), les sucs de rein, foie et muscle de lapin ;

Avec Rona (3), le suc de foie de bœuf et le sérum humain ;

Avec Deetjen (4) et Manwaring (5), les globules sanguins de cheval ;

Avec Oppler (6), le sérum et le plasma du cheval ;

Avec Mac Lester (7), le plasma de bœuf ;

Avec Lussana (8), le cristallin de porc et la substance cérébrale de veau.

(1) E. ABDERHALDEN et Y. Tervuchi. — Das Verhalten einiger Peptide gegen Organextrakte. *Z. ph. Ch.*, XLVII, 466, 1906. — Studien über die proteolytische Wirkung der Presssäfte einiger tierischen Organe sowie des Darmsaftes. *Id.*, XLIX, 1, 1906.

(2) E. ABDERHALDEN et A. Hunter. — Weitere Beiträge zur Kenntniss der proteolytischen Fermente der tierischen Organe. *Z. ph. Ch.*, XLVIII, 537, 1906.

(3) E. ABDERHALDEN et P. Rona. — Das Verhalten von Leucyl-phenylalanin, Leucyl-glycin-glycin und von Alanyl-glycil-glycine gegen Presssaft der Leber vom Rinde. *Z. ph. Ch.*, XLIX, 31, 1906.

(4) E. ABDERHALDEN et H. Deetjen. — Über den Abbau einiger Polypeptide durch die Blutkörperchen des Pferdes. *Z. ph. Ch.*, LI, 334, 1907. — Weitere Studien über den Abbau einiger Polypeptide durch die roten Blutkörperchen und die Blutplättchen des Pferdeblutes. *Z. ph. Ch.*, LIII, 280, 1907.

(5) E. ABDERHALDEN et W.-H. Manwaring. — Über den Abbau einiger Polypeptide durch die roten Blutkörperchen und die Blutplättchen des Rinderblutes. *Z. ph. Ch.*, LV, 377, 1908.

(6) E. ABDERHALDEN et B. Oppler. — Über das Verhalten einiger Polypeptide gegen Blut-Plasma und-Serum vom Pferde. *Z. ph. Ch.*, LIII, 294, 1907.

(7) E. ABDERHALDEN et J.-S. Mac Lester. — Über das Verhalten einiger Polypeptide gegen das Plasma des Rinderblutes. *Z. ph. Ch.*, LV, 571, 1908.

(8) E. ABDERHALDEN et Fil. Lussana. — Weitere Versuche über den

D'une façon générale l'activité peptolytique des sucs d'organes est plus étendue que celle des sécrétions digestives.

Voici, brièvement rapportés, les faits observés.

PEPTIDES DÉDOUBLÉS

PEPTIDES NON DÉDOUBLÉS

Bœuf.

Suc de foie.

glycyl-glycine
leucyl-leucine
leucyl-phénylalanine (déd. asym.)
leucyl-glycyl-glycine
alanyl-glycyl-glycine
d-l-leucyl-glycine
glycil-d-l-alanine

anh. du glycocole
r. leucyl-leucine

Suc de muscle.

glycyl-glycine
d. l. leucyl-glycine
glycil-d-l-alanine (faiblement)

Plasma.

d-l-alanyl-glycine
diglycyl-glycine
glycyl-d-l-alanine (faiblement)

glycyl-l-tyrosine

Chien.

Suc de foie.

glycyl-glycine
glycyl-l-tyrosine

Suc de muscle.

glycyl-glycine
glycyl-l-tyrosine.

Suc de rein.

glycyl-glycine

Abbau von Polypeptiden durch die Presssäfte von Zellen und Organen.
Z. ph. Ch., LV., 390, 1908.

PEPTIDES DÉDOUBLÉS.

PEPTIDES NON DÉDOUBLÉS.

Cheval.

Globules sanguins

d-l-alanyl-glycine
glycyl-l-tyrosine
d-l-alanyl-glycyl-glycine
glycyl-d-l-leucine
diglycyl-glycine
d-l-alanylglycine
glycyl-d-l-alanine

Sérum et plasma

d-l-alanylglycine
triglycyl-glycine
glycyl-d-l-alanine
glycyl-d-l-leucine
diglycyl-glycine
d-l-alanyl-glycyl-glycine

glycyl-l-tyrosine
d-l-leucyl-glycyl-glycine

Lapin.

Sac de rein, foie, muscle.

d-l-leucyl-glycine (déd. asym)
glycyl-d-l-alanine (id.)
glycyl-glycine

Homme.

Sérum.

glycyl-l-tyrosine

Porc.

Cristallin.

d-l-alanyl-glycine
glycyl-l-tyrosine
diglycyl-glycine

glycyl-d-l-alanine

Veau.

Cerveau.

d-l-alanyl-glycine
diglycyl-glycine

glycyl-d-l-alanine
glycyl-l-tyrosine

En dehors des faits particuliers relatifs au dédoublement des peptides par les humeurs et tissus à l'état physiologique, la méthode d'ABDERHALDEN est susceptible d'éclairer le mécanisme de la formation dans l'organisme de certaines substances à l'état pathologique. Mais le développement de ce point et de quelques questions connexes nous entraînerait au delà du sujet de cette thèse.

*
* *

Deux diastases ont encore leur place marquée dans ce chapitre — deux diastases que l'on ne range pas habituellement parmi les ferments protéolytiques mais dans le groupe des diastases « coagulantes ». Or, ce groupe des diastases de coagulation — qui comprend avec la *plasmase* et le *ferment de la myosine*, auxquels je fais allusion ici, la présure et la pectase — n'a guère de raison d'être s'il est vrai que les phénomènes de coagulation provoqués par ces diastases sont toujours précédés d'un phénomène d'hydrolyse.

Nous aurons bientôt à revenir sur cette question à propos de la présure.

En cette place, il suffira de consacrer quelques lignes à la *plasmase*, l'étude du phénomène de coagulation du sang avec tous les détails qu'il comporte déborderait le sujet de ce mémoire.

Sous le nom de plasmase, de thrombine, ou de fibrin-ferment, on désigne un ferment soluble que les globules blancs du sang sécrètent sous l'influence de certaines excitations mécaniques (A. DASTRE).

Cette diastase serait sécrétée sous une forme inactive, sous celle d'un proferment (proplasmase) et serait transformée en ferment actif (plasmase) par les sels de calcium (A. PEKELHARING).

La plasmase agit sur le *fibrinogène*, globuline renfermée dans le sang circulant et *débouffe* cette substance en deux globulines l'une, la *fibrino-globuline*, qui reste en dissolution; l'autre, la *fibrine*, qui se coagule (HAMMARSTEN).

Cette interprétation fait de la plasmase une diastase pro-

téolytique: l'existence dans le sérum, après la coagulation, d'une fibrino-globuline différente de la sérumglobuline, le fait que le poids de fibrine formée est toujours inférieur au poids de la substance fibrinogène d'où elle dérive, sont des arguments d'un grand poids pour la défense de cette interprétation.

Dans le plasma musculaire existent plusieurs substances protéiques; l'une d'elles, le myosinogène serait, sous l'influence d'un ferment, le *myosin-ferment*, dédoublée en une myoglobuline et en myosine qui se coagule. La coagulation du plasma musculaire serait alors susceptible de la même interprétation que la coagulation du sang et le ferment de la myosine devrait prendre place parmi les ferments protéolytiques. Il est légitime de présenter les faits sous une forme purement hypothétique, car la séparation du myosinogène et de la diastase n'a pas été réalisée jusqu'ici d'une façon entièrement satisfaisante.

CHAPITRE VI.

FERMENTS PROTÉINOLYTIQUES

des Plantes.

On trouve chez les plantes des protéases, des amino-acides, comme la leucine et la tyrosine, des dérivés d'acides aminés comme l'asparagine. Cette seule constatation permet de penser que des diastases analogues à celles des animaux président chez elles aux transformations des matières protéiques.

On a effectivement caractérisé chez les végétaux un grand nombre de protéases. Que celles-ci appartiennent à des types différents, que beaucoup soient distinctes des protéases d'origine animale, c'est ce que l'ensemble un peu touffu des recherches sur ce sujet démontre amplement. Il paraît néanmoins difficile de les répartir en groupes homogènes. Cette difficulté provient de ce que les auteurs ont désigné sous un même nom des diastases agissant sur des substances protéiques essentiellement différentes, ou, sur une même substance dans des conditions non comparables.

VINES a fait une tentative, à mon sens incomplète, pour grouper logiquement ces diastases végétales. E. ABDERDALDEN applique à leur distinction la méthode qui prend pour base leur action sur les peptides optiquement actifs.

Dans l'état actuel de la Science, il m'a paru impossible d'en présenter une étude systématique satisfaisante. Aussi je les groupe toutes dans un même chapitre. Nous étudierons d'abord la *papaïne*, de ces diastases la seule importante au point de

vue des applications pharmaceutiques. Puis nous parcourrons les diastases végétales des protéines dans un ordre que la Botanique plus que la Chimie inspire, en nous arrêtant de temps en temps sur celles dont l'étude est assez documentée pour mériter une courte monographie.

∴

A. **Papaïne.**

§ 1. *Origine et extraction.*

On désigne sous le nom de *papayotine* (PECKOLT, 1879, *papaïne* WÜRTZ, 1879, *papayacine* BALCKE, 1880) un ferment protéolytique que l'on rencontre dans le latex du *Carica papaya* L.

Le *Carica papaya* L. (*Papaya carica* GÆRTN., *P. orientalis* COL., *Papaya vulgaris* D. C.) est un bel arbre de 5 à 20 mètres de hauteur, originaire des Moluques, répandu dans l'Inde, les Antilles, le Brésil et presque toute l'Amérique du Sud. Son fruit appelé « papaye » est ovoïde, marqué de sept à huit côtes, de la grosseur d'un petit melon ; aux Antilles françaises et anglaises, on donne au papayer le nom d'arbre à melons.

De l'histoire botanique de cet arbre le seul point qui nous intéresse ici, c'est la présence dans tous ses membres, racines, tronc, feuilles, dans ses fruits et dans ses graines, d'un appareil laticifère dont TRÉCUL et SCHACHT ont fait l'étude.

Le latex est blanc, visqueux, amer sans âcreté ; il coagule spontanément et rapidement, en donnant un caillot blanc baigné d'une petite quantité de sérum.

On le recueille en pratiquant des incisions sur le tronc, mais le suc le plus actif se retire des fruits avant maturité. Au moyen d'un instrument en forme de peigne, en bois, et à dents un peu fortes, on crible le fruit de piqûres : il s'en échappe de petites gouttes laiteuses qu'on recueille et laisse durcir au soleil.

Ce latex desséché se présente sous forme de petites larmes irrégulières, blanc-jaunâtre, qui rougissent en vieillissant. On

le trouve peu sous cette forme dans le commerce où il atteint un prix élevé. C'est, quand elle n'est pas falsifiée, la meilleure des matières premières pour la préparation de la papaine.

Sous sa forme commerciale la plus habituelle, la drogue se présente sous l'aspect d'une poudre grossière blanc grisâtre. Pour l'obtenir, on écrase les fruits en présence d'une petite quantité d'eau et l'on presse. Le suc décanté est étalé en couches minces, exposé au soleil jusqu'à dessiccation.

Parfois le suc décanté ou même filtré est additionné d'alcool, il se fait un volumineux précipité que l'on recueille, presse et met à dessécher au soleil.

Les produits commerciaux sont d'activité très variable ; il n'est pas rare de rencontrer des échantillons dénués de toute activité (1).

La *papaine* des pharmacies s'extrait des différentes sortes commerciales de suc brut. La drogue est réduite en poudre fine et dissoute dans l'eau ; on filtre, on précipite la liqueur par dix volumes d'alcool fort. Le coagulum recueilli est à nouveau dissous dans l'eau puis reprecipité au moyen d'alcool. Finalement on le dessèche à l'étuve à 70° et on le pulvérise.

En partant de larmes de premier choix, faisant des séries de précipitation à l'alcool absolu et dialysant le produit de la dernière opération on arrive à obtenir des papaines de titre très élevé — jusqu'à 2000 — (Byla). Mais les papaines des pharmacies n'ont pas un titre supérieur à 80.

*
* *

Les premières notions chimiques relatives au suc du papayer sont dues à VAUQUELIN (2). CHARPENTIER DE CORSIGNY lui ayant rapporté, de l'île de France (3), divers échantillons de ce suc, VAUQUELIN les étudie et conclut que ce suc « à la matière colorante près, se rapproche du sang. » Il y avait trouvé une substance se rapprochant « de l'albumine du sang et de la fibrine animale. »

(1) Voir P. BYLA.— Les produits biologiques médicaux. Paris, J. Rousset, éditeur, 1904.

(2) VAUQUELIN.— Examen chimique du suc de papayer. *Annales de Chimie*, XVIII, 267, 1802.

(3) L'île Maurice.

Des observations faites de divers côtés ENDLICHER (1), ROY (2), MONCORVO (3) attirent l'attention sur les curieuses propriétés digestives de ce suc (4). WITTMACK, PECKOLT WÜRTZ et BOUCHUT rapportent ces propriétés à un ferment soluble.

Le ferment du fruit du papayer, d'après WITTMACK (5), est semblable à la pepsine : il digère les substances albuminoïdes, fait coaguler le lait, à une température pourtant plus élevée que celle-ci, à 60-65°.

PECKOLT (6) donne une analyse détaillée du suc et désigne sous le nom de « papayotine » une substance « amorphe, blanc de neige, non hygroscopique, insipide, insoluble dans l'éther, l'alcool, le chloroforme, soluble dans la glycérine et dans l'eau, dont la solution aqueuse, précipitable par l'alcool, l'acétate de plomb, le tanin, la soude, a la propriété de dissoudre les protéiques, mais n'attaque pas l'amidon et ne saponifie pas les graisses ».

De leur côté, WÜRTZ et BOUCHUT (7) isolent par précipitation alcoolique du suc de papayer spontanément coagulé une préparation diastasique qu'ils désignent sous le nom de *papaïne*.

(1) ENDLICHER. — Cité d'ap. Martin.

(2) ROY. — Papain. *Glasgow. Med. J.*, 1874, cité d'ap. Martin.

(3) MONCORVO. — Sur le *Carica papaya*. *J. de thérapie*, VII, 213 et 459, 1880.

(4) Ces propriétés étaient en réalité connues depuis déjà longtemps. Dès 1750, GREFFITH HUGHES (a) écrivait « que le suc de papayer contient une matière telle que, si on fait bouillir le fruit vert avec la viande la plus dure, elle devient tendre en quelques minutes. » Plus tard BROWNE (a) constatait que l'eau contenant une certaine quantité de suc, attendrit toutes les viandes à tel point qu'au bout de 8 à 10 minutes elles sont réduites en fragments. [(a) Cités d'après DUJARDIN-BEAUMETZ et EGASSE. *Les Plantes médicinales*, O. DOIN. Paris, 1889.]

(5) WITTMACK. — The fermentative action of the juice of the fruit of *Carica papaya*. *Ph. J. Trans.* [3], IX, 449, 1878. Voir aussi : Ueber den Melonenbaum *Carica papaya*, besonders über den Blüthenbau und die äusserst energische auflösende fermentative Wirkung des Milchsafte auf Eiweiss. *Sitz. Ber. d. Ges. naturf.*, Berlin, 1878, p. 40.

(6) PECKOLT. — *Carica papaya* and Papayotin. *Ph. J. Trans.* [3] X, 343, 383, 1879, et *Zeitschr. d. allgem. Oesterr. Apoth. Ver.*, XVII, 361, 373, 1879.

(7) WÜRTZ et BOUCHUT. — Sur le ferment digestif du *Carica papaya*, *C. R.*, CXXXIX, 425, 1879.

Cette substance, disent-ils, se rapproche de la pepsine par sa propriété de dissoudre la fibrine, mais s'en éloigne par ce caractère qu'elle la dissout non seulement en présence d'une petite quantité d'acide mais même dans un milieu neutre ou légèrement alcalin.

Sa composition est d'ailleurs variable et les analyses élémentaires donnent des résultats divergents de 46 à 53 % de C, de 14 à 18 % de N, déduction faite des cendres ; celles-ci, généralement abondantes de 4 à 10 %, sont constituées surtout par du phosphate de calcium.

A 50°, d'après WÜRTZ, la papaine dissout 1000 et 2000 fois son poids de fibrine avec formation de peptones non précipitables par l'acide nitrique et d'une petite quantité d'un corps amidé cristallisable offrant l'aspect de la leucine.

WÜRTZ observe que la papaine se fixe sur la fibrine, forme avec elle comme une combinaison qui, par l'action de l'eau, donne les produits solubles d'hydratation de la fibrine, en même temps que le ferment redevenu libre peut exercer son action sur une nouvelle quantité de fibrine, — et cette observation est le point de départ d'une explication générale du mode d'action des ferments solubles.

BOUCHUT (1) montre que la papaine n'agit pas seulement sur les « substances protéiques mortes mais aussi sur les tissus vivants sains ou pathologiques » : tissu nerveux, muscles, adénomes, cancers, fausses membranes diphtériques.

BALCKE (2), en 1880, signale à nouveau le ferment qu'il appelle *papayacine*, sans rien ajouter de nouveau à son histoire.

WÜRTZ. — Sur la papaine. Contribution à l'histoire des ferments solubles. *C. R.*, XC, 1379, 1880.

WÜRTZ. — Sur la papaine. Nouvelle contribution à l'histoire des ferments solubles. *C. R.*, XCI, 787, 1880.

WÜRTZ. — Note sur le mode d'action des ferments solubles. *C. R.*, XCIII, 1105, 1881.

(1) BOUCHUT. — Sur l'action digestive du suc de papaya et de la papaine sur les tissus sains ou pathologiques de l'être vivant. *C. R.*, XC, 617, 1880, et : De la dissolution des fausses membranes de l'angine couenneuse par les applications locales de papaine. *C. R.*, XCII, 1843, 1881.

(2) BALCKE. — *Die Chem. Ind.*, III, 357, (1880), d'ap. *Jahresb. d. Chem.*, 1075, 1880.

Celle-ci se développe d'ailleurs assez péniblement et les contradictions sont nombreuses entre les auteurs relativement aux conditions physico-chimiques de l'activité du ferment soluble et les produits de son action sur les substances protéiques. Nous ne nous arrêterons d'ailleurs pas à les relever toutes.

*
* *

§ 2. Conditions d'activité de la papaïne.

Ce sont les conditions de réaction de milieu et de température qu'il importe surtout de définir.

WÜRTZ avait dit que la papaïne agit en présence d'une légère acidité, mais aussi en milieu neutre ou même légèrement alcalin.

Puis tantôt les acides sont donnés comme nuisibles, et une légère alcalinité comme favorable à la protéolyse papaïnique (BRUNTON et WYATT (1), MARTIN (2), FR. DAVIS (3), RIDEAL (4), UMNEY (5)), tantôt au contraire un milieu acide comme plus avantageux qu'un milieu alcalin (HIRSCHLER (6), K. OSSWALD (7), DOTT (8)) ; acidité ou alcalinité paraît indifférente d'après les publications de ROSSBACH (9) et CHITTENDEN (10), tandis que

(1) BRUNTON et WYATT. — *Practitiones*, p. 301, 1880, cité d'ap. le suivant.

(2) MARTIN. — Papaïn-digestion. *J. of Physiol.*, V, 220, 1884.

(3) FR. DAVIS. — Papaïn-digestion. *The Ph. J.*, V, 220, 1893.

(4) RIDEAL. — The conditions of papaïn digestion. *Ph. J.*, XXV, 183, 1894.

(5) UMNEY. — Papaïn Bull. Royal Gartens Kew., 1897, d'ap. *Just. Jahresb.*, 38, II, 1897.

(6) HIRSCHLER. — *Ungr. Arch. f. Medic.*, I, 341, 1892, d'ap. *Malys. Jahresb.*, XXII, 19, 1892,

(7) K. OSSWALD. — Untersuchungen über das Papaïn. *Münch. med. Wochenschr.* n° 34, p. 665, 1894.

(8) J.-B. DOTT. — Papaïn as a digestive agent. *Ph. J. Trans.* [4], II, 182, 1896.

(9) ROSSBACH. — Physiologische und therapeutische Wirkungen das Papayotin und Papaïn. *Z. f. klin. Med.*, VI, 527, 1883.

(10) CHITTENDEN. — *Transact. of the connecticut Acad. of Arts and Sc.*, IX, 1892, cité d'ap. OPPENHEIMER. *Die Fermente*, 1903.

WEEG (1) donne l'une et l'autre comme également nuisibles et l'activité maxima comme placée à la neutralité.

HIRSCH (2), avec des préparations commerciales, obtient les résultats les plus discordants; avec une papaine extraite directement du suc, il fait, à 38°, digérer 57 % d'albumine d'œuf en milieu neutre, 52 % en milieu alcalin à 0,25 % NaOH, 36 % en milieu acide (0,27 % HCL).

Des faits contradictoires publiés, il paraît résulter que l'action est maxima en milieu neutre et que la zone d'activité ne débordé pas bien loin, aussi bien du côté de l'acidité que de l'alcalinité.

L'étude des conditions de température se présente d'abord avec des contours aussi indécis. Les expérimentateurs font leurs essais de digestion à des températures s'échelonnant de 35 à 50°. On ne peut, de leurs expériences, tirer une notion précise sur la température optima. RIDEAL (3) dit que la température la plus favorable est 50° et ROSBACH (3) affirme que la papaine agit aussi bien à froid qu'à 38°. S. MARTIN (3) établit qu'elle agit mieux à 36° qu'à 19°, WITTMACK (3) qu'elle a son maximum d'activité à 60-65°.

Pour la température de destruction, on a relevé : 82° pour la papaine en solution (V. HARLAY) (4) et des températures supérieures à 100° pour la papaine sèche (WÜRTZ (4), FERMI (4), HARLAY) (5).

Les observations de MM. DELEZENNE, MOUTON et POZERSKI (6) apportent des faits nouveaux et curieux.

(1) WEEG. — Ueber Papain. *Diss. Bonn*, 1885.

(2) HIRSCH. — Ueber Papain und seinen Werth als Digestivum. *Therap. Monatshefte*, VIII, 609, 1894 et Beitrag zur Kenntniss einiger Papayapräparate des Handels. *Ph. Zetschr.*, XXXIX, 325, 1894.

(3) *Loco citato*.

(4) V. HARLAY. — De l'application de la tyrosinase... *Thèse Doct. Univers.*, Paris, 1900.

(5) FERMI. — Die Leim und Fibrin lösenden und die diastatischen Fermente der Mikroorganismen. *Chem. Ctb.*, VI, 537 (1890).

(6) DELEZENNE, MOUTON et POZERSKI. — Sur l'allure anormale de quelques protéolyses produites par la papaine. *C.R. Biologie*, LX, 68, 1906. — Sur la digestion brusque de l'ovalbumine et du sérum sanguin par la papaine. *C. R. Biologie*, LX, 309, 1906.

MOUTON et POZERSKI. — Liquéfaction instantanée du blanc d'œuf par

La première notion qui se dégage de leurs expériences, c'est que l'optimum d'action de la papaïne est placé très haut, beaucoup plus haut que pour tout autre ferment soluble; il est compris entre 80 et 90° et voisin du premier chiffre.

A la température ordinaire, la papaïne n'exerce sur l'ovalbumine ou le sérum sanguin aucune action digestive; même à 40° (au moins dans les expériences de courte durée) la papaïne n'agit pas. Ce n'est point qu'à ces températures la papaïne n'exerce à proprement parler aucune action: si l'on ajoute une solution de papaïne à une solution de blanc d'œuf, on voit diminuer rapidement la viscosité de celle-ci, comme en témoignent les mesures faites au viscosimètre d'OSWALD.

La papaïne liquéfie *brusquement* l'albumine, *mais cette liquéfaction instantanée ne s'accompagne de la formation d'aucun produit de digestion.*

Il en est autrement si l'on porte *rapidement* de la température ordinaire à 100° un mélange d'albumine et de papaïne. Pour une dose convenable de ferment, la presque totalité de la substance protéique devient incoagulable par la chaleur; elle est transformée en albumoses et en peptones. Et le caractère le plus curieux de cette protéolyse, c'est la rapidité avec laquelle elle s'effectue; elle est réalisée dans le court espace de temps qui suffit à porter le liquide de 40 à 100°. Elle est si rapide qu'on ne l'empêche pas complètement par l'artifice qui consiste à projeter par gouttes le mélange dans l'eau bouillante. Plus les gouttes sont petites et espacées, moins grande est la quantité d'albumine digérée, mais celle-ci n'est jamais nulle.

Fait curieux et paradoxal, si l'on abandonne pendant un certain temps à la température du laboratoire (15 à 20° ou même à celle de l'étuve (40°), les mélanges d'albumine et de papaïne, avant de les porter à 100°, on constate que la réaction non seulement n'est pas complète mais qu'elle l'est moins. Après la papaïne à la température du laboratoire. *C. R. Biologie*, LXV, 86, 1908.

POZERSKI. — Digestion rapide par la papaïne à haute température de quelques tissus animaux. *C. R. Biologie*, LXIV, 1105, 1908 et Contribution à l'étude physiologique de la papaïne. *Thèse Doct. Sc. Paris*, 1908.

un contact préalable de 4 ou 5 heures, à la température du laboratoire, il n'est pas rare que la quantité de matières coagulables par la chaleur soit inférieure à la moitié de celle que donne une expérience de courte durée.

Ces faits, qui éloignent si complètement la papaïne de la pepsine et de la trypsine, ont été confirmés par JONESCU (1). Cet auteur a reproduit avec l'albumine d'œuf et le sérum sanguin les phénomènes décrits par DELEZENNE et ses collaborateurs ; il a montré en outre que, dans les mêmes conditions, le blanc d'œuf coagulé et la fibrine ne sont pas dissous par la papaïne.

SACHS (2), en confirmant à son tour les mêmes faits, porte surtout son attention sur le phénomène d'affaiblissement que paraît subir la papaïne par son contact à froid avec l'ovalbumine. Il signale un fait important : par addition préalable d'acide chlorhydrique on peut conserver au mélange sa force diastasique primitive, tandis qu'une addition ultérieure d'acide arrête simplement le phénomène d'affaiblissement, mais ne restitue pas le pouvoir diastasique primitif.

*
* *

§ 3. Les Produits de la digestion papaïnique.

La papaïne digère les substances protéiques en fournissant des albumoses, des peptones, et enfin les composés cristallisables qui résultent de leur hydrolyse profonde. C'est ce que WÜRTZ avait indiqué le premier ; c'est ce que confirme SIDNEY H. MARTIN (3), qui dans la digestion papaïnique de la fibrine comme dans celle des globulines et albumines végétales trouve à côté d'albumoses et de peptones de la leucine et de la tyrosine.

(1) JONESCU. — Ueber eine eigenartige Verdauung des Hühner-und Serum eiweiss durch Papain. *Bioch. Zeitch.*, II, 177, 1906.

(2) SACHS. — Über die Verdauung von rohem Hühner-eiweiss durch Papain. *Z. ph. Ch.*, LI, 488, 1907.

(3) S. H. MARTIN. — The nature of papain and its action on vegetable proteid. *J. of Physiol.*, V, 213, 1884 et VI, 336, 1885.

La question n'apparaît pourtant pas comme résolue puisque, pour NEUMEISTER (1), les produits formés dans la décomposition du blanc d'œuf par la papaine sont identiques aux produits de décomposition de cette substance par la vapeur d'eau, puisque CHITTENDEN (2) se borne à doser deutéroalbumoses et peptones formées dans cette digestion et que SHARP (3) et RIDEAL (4) polémiquent sur la question de savoir s'il se forme ou non des peptones dans cette protéolyse.

En 1900, M. HARLAY (5) compare les produits de digestion papainique à ceux des digestions pepsiques et pancréatiques au point de vue de l'action de la tyrosine et de l'eau de brome.

Quand on additionne de macéré de *Russula delica* des liquides provenant de digestions papainiques (de fibrine, d'ovalbumine, de caséine, de cong lutine, de gluten, de chair musculaire), il se produit rapidement une coloration rouge à laquelle, lentement, succède une couleur verte. Le pigment vert (vert papainique) paraît identique au vert pepsique. Nous n'avons malheureusement aucun renseignement sur sa nature pas plus que sur celle du chromogène d'où il dérive. On s'étonnera de ne pas voir apparaître ici la coloration rouge, puis noire caractéristique de la tyrosine, alors que ce corps, comme M. HARLAY s'en est assuré, est présent dans les liquides de digestion. C'est, explique l'auteur, que la tyrosine est en trop faible quantité dans les digestions papainiques et que la coloration est masquée ou même l'action oxydante de la tyrosinase accaparée par le chromogène verdissant.

L'eau de brome qui, nous l'avons vu, permet aussi de distinguer la digestion pepsique de la digestion pancréatique, donne, avec les produits de digestion papainique, une coloration rose violacé rappelant, quoique plus faible, la coloration que don-

(1) NEUMEISTER. — The nature of papain and its action on vegetable proteid. *Z. f. Biol.*, XXVI, 57, 1890.

(2) CHITTENDEN. — The nature of papain and its action on vegetable proteid. *Ann. J. of Physiol.*, I, 634, 1893.

(3) Gordon SHARP. — The nature of papain and its action on vegetable proteid. *Ph. J. Trans.*, LIII, 637, 757, 1894.

(4) RIDEAL. — The condition of Papain digestion. *Ph. J. Trans.*, XXV, 183, 1894.

(5) HARLAY. — Thèse citée.

nent, dans les mêmes circonstances, les produits de digestion pancréatique.

Ainsi, les digestions papaïniques ne donnent pas la réaction tyrosinique, mais elles donnent la réaction tryptophanique ; la papaïne présente, dans son action, des traits communs avec la pepsine d'une part, la trypsine de l'autre, et sa place paraît, à ce point de vue, intermédiaire entre les deux principaux ferments protéolytiques des animaux.

Pourtant, en 1901, MENDEL et UNDERHILL (1) ne parvenaient à caractériser ni la leucine, ni la tyrosine, ni le tryptophane, dans les produits de digestion papaïnique et considéraient son mode d'action comme tout à fait différent de celui de la trypsine.

Bien opposées sont les conclusions d'EMMERLING (2).

EMMERLING étudie les produits de la digestion *prolongée* de la fibrine par la papaïne, prolongée parce que l'action du ferment, à la température à laquelle il opère (37°), est lente, et qu'il est indispensable de faire des additions successives de ferment. La lenteur même de cette protéolyse distingue la papaïne de la trypsine, mais les produits intermédiaires, albumoses, peptones, sont les mêmes et les termes ultimes sont identiques, sinon quantitativement, au moins qualitativement.

Il isole en effet le glycocolle, l'alanine, la leucine, un acide aminovalérianique, l'acide aspartique, la tyrosine, l'arginine, la proline et peut-être la phénylalanine.

Les résultats de KUTSCHER et LOHMANN (3) ne diffèrent pas des précédents. A la liste des corps reconnus ils ajoutent l'histidine, la lysine, la tryptophane. Ils ne trouvent ni tétra ni pentaméthylène diamine qu'à tort ou à raison ils prétendent caractéristiques des digestions pepsiques prolongées.

Ces résultats intéressent les digestions papaïniques de *longue durée* ; dans les digestions brusques provoquées dans les conditions décrites par DELEZENNE, on ne trouve pas d'amino-aci-

(1) MENDEL et UNDERHILL. — *Trans. conn. Academy of Arts and Sciences*, 1901, d'ap. *Malys Jahresb.*, XXXII, 392, 1902.

(2) EMMERLING. — Ueber die Eiweissspaltung des Papayotin. *Ber. chem. Ges.*, XXXV, 695, 1012 (1902).

(3) KUTSCHER et LOHMANN. — Zur Kenntniss der Papayotin verdauung. *Z. ph. Ch.*, XLVI, 383, 1905.

des; la digestion rapide, à haute température, de l'albumine s'arrête aux peptones (JONSEN).

L'ensemble des faits qui précèdent montre que la papaine possède parmi les ferments protéolytiques une physionomie propre. Nous retrouverons quelques-uns de ses traits chez d'autres protéases végétales, mais jusqu'ici aucune ne saurait être identifiée avec elle.

..

§ 4. *Applications pharmaceutiques*

Les propriétés de la papaine sont mises à profit en thérapeutique. Utilisée dans les pays d'origine pour détruire les vers intestinaux, préconisée par BOUCHUR pour dissoudre les pseudomembranes diphtériques, elle n'est guère utilisée chez nous qu'à titre d'adjuvant des ferments gastrique et pancréatique. On utilise la papaine pure au sens commercial ou additionnée de lactose.

Les préparations galéniques dont elle est la base sont des cachets, sirops, élixirs, etc., dont les formulaires donnent des formules variées. On l'associe souvent à la pepsine ou à la pancréatine.

M. HARLAY, qui a étudié les actions réciproques des trois ferments protéolytiques, a constaté que pancréatine et papaine ne se détruisent pas, mais ajoutent leurs actions, que la pepsine n'agit pas nettement sur la papaine, mais que la papaine en milieu neutre ou légèrement acide détruit partiellement la pepsine.

Elle peut être ingérée impunément à doses élevées. Son action physiologique, quand elle pénètre par d'autres voies, échappe au cadre de ce travail. Pour mémoire seulement, je rappelle les résultats obtenus par M. POZERSKI en injectant à des animaux de laboratoire des solutions de papaine : formation d'anticorps spécifiques dans leur sang et phénomènes d'anaphylaxie.

On a préparé des peptones médicinales papainiques. La peptone d'ANTWEILER est préparée par digestion de la viande au

moyen du suc de Carica. Nous avons vu, d'après HARLAY, les réactions colorées qui distinguent ces peptones papaitiques des peptones pepsiques et des peptones pancréatiques. On a également préparé des « extraits papainiques » d'organes expérimentés dans la médication opothérapique (DASTRE et FLORESCO).

* *

B. Diastases protéinolytiques des graines. Protéase du malt.

Ce sont des protéases qui dans les graines effectuent, lors de la germination, l'hydrolyse des protéiques de réserve, la formation de leucine, de tyrosine, d'arginine, dont SCHULZE (1) a, dans les graines de vesce, de pois, de lupin, étudié l'apparition, la répartition, et la disparition avec formation corrélative d'asparagine.

Les premiers faits sont dus à GORUP-BESANEZ (2) qui voit les extraits glycerinés de diverses graines (vesce, lin, chanvre, orge germée) capables de dissoudre des fragments de fibrine et d'entamer des cubes de blanc d'œuf coagulé. Puis viennent les observations de VAN DER HARST (3), les essais discordants de KRAUCH (4), plus tard les expériences de JOHANSEN (5).

(1) SCHULZE. — Ueber den Umsatz der Eiweissstoffe in den lebenden Pflanze. *Z. ph. Ch.*, XXIV, 18 (1897), XXX, 241 (1900).

(2) GORUP-BESANEZ et WILL. Ueber den Vorkommen eines diastatischen und peptonbildenden Ferments in den Wickensamen. *Ber. chem. Ges.*, VII, 1478, (1874). Weitere Beobachtungen über diastatische u. peptonbildende Fermente im Pflanzenreich, *idem*, VIII, 1510 (1875). Fortgesetzte Beobachtungen über peptonbildende Fermente im Pflanzenreich, *idem*, IX, 673 (1876).

(3) VAN DER HARST. — D'ap. *Bot. Jahresber.*, II, 867, 1876.

(4) KRAUCH. — Beitr. z. Kenntniss der ungeformten Fermente im Pflanzenreich. *Landw. Versuchst.* XXIII, 77 (1879).

Über peptonbildende Fermente in der Pflanzen. *Landw. Versuchst.* XXVII, 383, 1882.

(5) JOHANSEN. — D'ap. *Bot. Jahresb.*, I, 134, 1886.

Mais c'est GREEN (1) qui établit avec certitude l'existence de protéases dans les graines germées.

Il fait germer des graines de *Lupinus hirsutus*, et après quatre jours il en fait des extraits glycéринés. Ces extraits dialysés digèrent à 40° la fibrine en milieu faiblement acide (0,2 % HCl), avec formation de protéoses, de leucine et de tyrosine, la marche de la digestion paraissant, dit-il, en tout semblable à celle que provoque la papaïne. Il obtient des résultats analogues avec les semences de *Ricinus communis*.

NEUMEISTER (2) recherche, dans une série de graines, la présence de diastases protéolytiques, en mettant à profit la propriété que possède la fibrine de les fixer. Il fait avec les graines, tantôt germées, tantôt non, des macérations aqueuses ; il y plonge des fragments de fibrine qu'il transporte ensuite dans de l'eau faiblement acidulée. Il observe s'il y a ou non digestion de la fibrine. Les résultats sont positifs avec les graines germées d'orge, de pavot, de betterave, de blé, négatifs avec un bien plus grand nombre. Dans les graines au repos, on ne trouve pas de protéase.

BUTKEWITSCH (3) étudie à son tour les plantules de *Lupinus angustifolius*, *L. luteus*, *Vicia faba*, *Ricinus major*. Chez toutes il constate la présence de diastases protéolytiques. D'un macéré glycéринé de plantules de *Lupinus angustifolius*, il extrait, par l'alcool, un précipité diastasique qui est énergiquement protéolytique, digère la cong lutine, par exemple, avec formation de leucine, de tyrosine et probablement de bases hexoniques. Cette diastase paraît agir surtout à la neutralité : elle est moins active en présence de CO_3Na^2 à 0,1 % ou d'HCl à 0,2 % ; en présence d'HCl elle ne forme pas de corps

(1) GREEN.— On the changes in the proteids in the seed which accompany germination. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, CLXXVIII, 39, 1887.— On the germination of the seeds of the Castor oil plant (*Ricinus communis*). *Proc. Roy. Soc.*, XLVIII, 370, 1890. — On vegetable ferments. *Ann. of Botany.*, VII, 83, 1893.

(2) R. NEUMEISTER. — Uber das Vorkommen und Bedeutung eines eiweisslösendes Enzyms in jugendlichen Pflanzen. *Z. f. Biol.*, XXX, 447, 1894.

(3) W. E. BUTKEWITSCH. — Ueber das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms in gekleiteten Samen und über seine Wirkung. *Z. ph. Ch.*, XXXII, 1, 1901.

précipitables par l'acide phosphotungstique. L'acide cyanhydrique paraît, à petite dose, favoriser son action.

*
* *

Le mieux étudié des ferments protéolytiques de graines est celui de l'orge en germination.

KJELDAHL (1) avait constaté, par des expériences restées inédites, l'existence dans le malt de l'enzyme à laquelle par anticipation, on avait donné le nom de peptase. NEUMEISTER, au cours du travail précédemment cité, avait observé la peptonisation de filaments de fibrine plongés dans des macérés d'orge germée.

LASZCZYNSKI et LOÉ avaient publié des résultats opposés.

Ce sont MM. FERNBACH et HUBER (2) qui ont établi avec certitude l'existence de cette protéase et qui en ont fixé les traits essentiels. Le travail postérieur de WEISS (3) apporte lui aussi des documents précis. Il y a peu de faits à retenir des publications de WINDISCH et SCHELLHORN (4), de PETIT et LABOURASSE (5), contemporaines de celles de M. FERNBACH.

La protéase de l'orge existe dans le grain qui germe ; on la trouve dès le quatrième jour de la germination.

Cette protéase hydrolyse les substances albuminoïdes du malt. L'albumine coagulable d'une macération aqueuse de malt, préparée à froid et filtrée à la bougie, devient incoagulable lorsqu'on abandonne cette macération à l'autodigestion à des températures comprises entre la température ordinaire et 70° (FERNBACH et HUBER).

(1) D'après WEISS.— *Cité ci-après*.

(2) FERNBACH et HUBER. — Sur la diastase protéolytique du malt. *C. R.*, CXXX, 1783, 1900.

(3) WEISS. — Ueber ein proteolytischen und ein eiweisskoagulirendes Enzym in gekeimter Gerste. *Z. ph. Ch.*, XXXI, 79, 1900.— Etudes sur les enzymes protéolytiques de l'orge en germination. *C. R. Trav. du Lab. de Carlsberg*, V, 133, 1903.

(4) WINDISCH et SCHELLHORN. — Ueber das eiweisspaltende Enzym der gekeimten Gerste. *Woch. f. Brauerei*, XVII, 29, 1900.

(5) PETIT et LABOURASSE.— Sur la solubilisation des matières azotées du malt. *C. R.*, CXXXI, 349, 1900.

Elle digère les albumines végétales retirées de diverses graines, seigle, avoine, froment, auxquelles KJELDAHL avait réservé le nom de glutines, protéines solubles dans l'alcool à 55°, incoagulables par les acides et par la présure. La protéase du malt digère la gélatine (F. et H.), la caséine du lait, l'albumine de l'œuf qui est, à vrai dire, assez difficilement attaquée, et la fibrine qui l'est au contraire énergiquement WEISS.

La réaction favorable à son activité est la réaction acide. Celle-ci peut être définie plus nettement (F. et H.). C'est celle qui est donnée comme acide par le tournesol et comme neutre par le méthylorange. C'est l'acidité des phosphates monobasiques. Ceux-ci accélèrent l'action de la protéase du malt, comme ils accélèrent l'action de son amylase : les phosphates secondaires au contraire la retardent.

La protéase du malt forme aux dépens des substances protéiques des albumoses, des peptones, et, poussant la transformation plus à fond, des corps aminés cristallisables.

Ce travail, au reste, n'est peut-être pas l'œuvre d'une seule diastase. WEISS pense qu'elle est celle de plusieurs, de deux au moins. La protéase du malt serait l'association d'une *peptase* et d'une *tryptase*. Leur séparation, qui serait évidemment la meilleure démonstration de leur coexistence, n'a pu être réalisée qu'incomplètement ; en précipitant par l'alcool absolu un extrait de malt, on obtient une préparation à propriétés presque exclusivement pepsiques. D'autre part, l'analyse des liquides de digestion au moyen de divers précipitants chlorure stanneux, acide tannique, etc., l'examen des courbes traduisant les transformations observées à diverses températures, l'étude de l'action des antiseptiques témoignent en faveur de la coexistence de deux protéases.

L'association dans les graines et l'observation s'applique à beaucoup d'organes végétaux) d'au moins deux protéases l'une s'adressant aux plus élevées des protéines pour en faire des protéases, l'autre s'adressant à ces dernières pour les briser en molécules simples comme celles des acides-aminés, cette

association a été particulièrement soutenue, ces dernières années, par VINES (1).

Dans les graines en repos, ou tout au début de la germination, on trouve une diastase qui attaque les protéoses, qui, par exemple, digère activement la peptone de Witte; l'auteur l'appelle *éreptase*; plus tard apparaît une diastase susceptible de peptoniser la fibrine, c'est une *peptase*.

En fait, leur séparation n'est pas, au cours du développement, aussi tranchée que je l'indique ici schématiquement et, pour que leur coexistence soit bien démontrée, il importe, dans une même préparation diastasique, de pouvoir séparer les deux actions. Il semble que M. VINES y soit parvenu.

Voici la technique (2): on fait une macération concentrée de graines dans une solution de NaCl à 10 %/o. — On s'adresse à des graines de vesce de pois, ou mieux à des graines de chanvre, les graines huileuses étant plus riches en protéases que les graines amylacées. — Le macéré est acidulé par l'acide acétique. Il se fait un précipité que l'on recueille.

La liqueur filtrée est nettement peptolytique et n'a aucune action sur la fibrine. Le précipité est lavé avec une solution de NaCl à 10 %/o acidulée par l'acide acétique, puis le résidu mis à macérer dans l'eau distillée fournit une liqueur uniquement peptonisante; elle digère activement la fibrine, mais n'agit pas sur la peptone de Witte. L'étude de ces deux diastases isolées n'a pas encore été faite, la première, l'*éreptase*, se rattache assurément à l'érepsine que nous avons étudiée, puisqu'elle s'adresse aux substances protéiques déjà dégradées, aux protéoses; pourtant l'érepsine végétale est sensibilisée par les acides, tandis que l'érepsine des animaux le serait par les alcalis. VINES utilise ce fait pour les opposer l'une à l'autre. Je ne saurais insister sur ce point qui me paraît mériter de nouvelles recherches.

Quant à la seconde, la *peptase*, son optimum d'action paraît placé à l'acidité naturelle des extraits végétaux ou à une

(1) VINES. — Proteolytic Enzymes in Plants. *Ann. of Botany.*, XVII, 237, 597, 1903. — Proteases of Plants. *Ann. of Botany.* XVIII, 290. 1904. — XIX, 149, 1905. — XIX, 171, 1906. — XXII, 103, 1908.

(2) *Loc. cit.*, XXII, 103, 1908.

légère acidité chlorhydrique. Il est regrettable que jusqu'ici l'examen de ce point important n'ait pas été approfondi comme il l'a été par FERNBACH pour la protéase du malt; jusqu'à plus ample renseignement, on est autorisé à penser que les peptases des graines en général se comportent comme celle du malt et que toutes ces diastases forment une famille naturelle.

..

C. Ferments protéinolytiques des feuilles, des fruits. — Broméline. — Plantes carnivores.

L'appareil végétatif des Phanérogames, leurs feuilles en particulier, contiennent des ferments des protéines. On peut les caractériser dans les sucs aqueux herbacés. Il n'est pas douteux que les ferments protéinolytiques de ces sucs se rattachent comme ceux des graines à des types différents.

J'ai eu ailleurs l'occasion d'insister sur la nécessité de leur distinction et sur l'utilité de leur appliquer une nomenclature rationnelle.

Dans quelques-uns de ces sucs, en particulier celui du *Lolium perenne*, j'ai trouvé une érepsine, dont je n'ai d'ailleurs pas approfondi l'étude (1). VINES (2), à la même époque, a trouvé cette même diastase peptolytique dans les organes végétatifs, racines, bulbes, tubercules, feuilles et dans les fruits d'un grand nombre de plantes Phanérogames.

Cette diastase, dans la majorité des cas, est la seule diastase protéinolytique contenue dans le suc cellulaire; dans les autres elle se trouve associée à une diastase fibrinolytique. Le suc d'ivraie digère les protéoses mais n'attaque ni la fibrine cuite, ni l'ovalbumine coagulée (J). Le suc des feuilles de tilleul et de rhubarbe renferme seulement de l'érepsine (V). Le suc du fruit de *Cucumis melo* ou de *Cucurbita pepo*, le suc d'asperge digère les protéoses, peptonise la fibrine (V.).

(1) M. JAVILLIER. — Sur quelques ferments protéolytiques associés à la présure chez les végétaux, *C. R.*, CXXXVI, 1765, 1903.

(2) *Loc. cit.*, XVII, 237, 1903.

Ces diastases, au reste, n'ont pas été l'objet de monographies suffisantes pour qu'elles nous retiennent longuement. Il suffira de signaler le ferment analogue à la papaïne trouvé par BOUCHUT (1) dans le suc des *Ficus carica* et *macrocarpa*, ceux aussi dont la présence a été constatée par GREEN (2) dans les fruits du *Cucumis utilissimus*, par DACCOMO et TOMMASI (3) dans *Anagallis arvensis*.

Sous le nom de *Broméline*, CHITTENDEN (4) a étudié une diastase protéolytique que l'on rencontre dans le suc de l'ananas et que MARCANO (5) avait signalée en 1891. Par différentes méthodes, CHITTENDEN a retiré du suc des précipités diastasiques doués d'un pouvoir digestif considérable.

La broméline digère avec une inégale activité la fibrine, l'albumine d'œuf coagulée, la myosine. Elle est active en solution très faiblement alcaline, neutre, ou faiblement acide; la fibrine est digérée aussi bien en solution neutre qu'en solution acide, l'albumine coagulée est digérée le plus activement en solution neutre, la myosine en solution acide à 0,025 ‰.

La température optima est voisine de 60°.

Les produits de la réaction sont des albumoses, des peptones, et, si la digestion est suffisamment prolongée des acides aminés en quantité appréciable.

M. POZERSKI (1) a retrouvé avec la broméline quelques-uns des faits qu'il a observés avec la papaïne. Lorsqu'on mélange de l'ovalbumine liquide ou du sérum à une quantité convenable de jus d'ananas fraîchement exprimé et filtré et qu'on porte le mélange aussitôt fait à la température d'ébullition, on constate, comme avec la papaïne, une digestion très considérable. Ce phénomène de digestion brusque rend plus net encore le parallélisme de propriétés entre les deux ferments.

(1) BOUCHUT. — Sur un ferment digestif contenu dans le suc de figuier, *C. R.*, XCI, 67, 1880.

(2) GREEN R. — On the occurrence of vegetable trypsin in the fruit of *Cucumis utilissimus*. *Ann. of Bot.*, VI, 195, 1892.

(3) DACCOMO et TOMMASI. — D'ap. *Chem. Ctb.*, II, 532, 1892.

(4) CHITTENDEN. — On the proteolytic action of Bromelin, the ferment of Pine-apple juice. *J. of Physiol.*, XV, 259, 1894.

(5) MARCANO. — *Bull. of Pharm.*, V, 77, 1891.

(6) Thèse citée.

Il est difficile de parler en connaissance de cause des diastases protéolytiques des plantes dites carnivores ; l'existence même de ces diastases reste pour nombre d'auteurs sujette à caution.

Pour mémoire seulement, je rappelle qu'on a attribué à diverses espèces de *Nepenthes* et de *Drosera*, à *Dionaea muscipula*, *Drosophyllum lusitanicum*, *Sarracenia purpurea*, *Pinguicula vulgaris*, *Aldrovandia vesiculosa*, *Utricularia vulgaris* et quelques autres plantes la propriété de tuer, digérer et absorber les proies vivantes qui viennent à s'égarer sur leurs feuilles.

Pour les *Nepenthes* et les *Drosera*, on a apporté, au milieu d'arguments contradictoires, quelques faits assez probants pour qu'on puisse au moins esquisser l'histoire de leurs diastases protéolytiques.

La « *nepenthine* » se rencontre dans le suc des urnes des *Nepenthes*. Affirmée par GORUP-BESANEZ (1), LAWSON-TAIT (2), VINES (3), CLAUTRIAU (4), niée par TISCHUTKIN (5), R. DUBOIS (6), COUVREUR (7), elle doit à VINES (2) et à CLAUTRIAU l'établissement de ses principaux caractères.

(1) GORUP-BESANEZ. — Fortgesetzte Beobachtungen über peptonbildende Fermente im Pflanzenreich. *Ber. chem. Ges.*, IX, 673, 1876.

(2) LAWSON-TAIT. — Insectivorous Plants. *Nature*, XII, 251, 1870.

(3) VINES. — On the digestive ferment of *Nepenthes*. *J. of Anat. and Physiol.*, XI, 1876. — The digestive ferment of *Nepenthes*. *Ann. of Bot.*, XI, 1896. — The protéolytic enzyme of *Nepenthes*. *Ann. of Bot.*, XI, 563, 1897. — XII, 545, 1898. — XV, 563, 1901.

(4) CLAUTRIAU. — Digestion dans les urnes de *Nepenthes*. *Mém. cour. Ac. roy. de Belgique* (1900).

(5) TISCHUTKIN. — Ueber die Rolle der Mikroorganismen bei der Ernährung der insektenfressenden Pflanzen, d'ap. *Bot. Ctbl.*, L. 304, 1892 et LIII, 322, 1893.

(6) R. DUBOIS. — Sur le prétendu pouvoir digestif du liquide de l'urne des *Nepenthes*. *C. R.* CXI, 315, 1890.

(7) COUVREUR. — A propos des résultats contradictoires de M. R. DUBOIS et de M. VINES, sur la prétendue digestion chez les *Nepenthes*. *C. R.* CXXX, 848, 1900.

La *népenthine* agit sur les substances protéiques en milieu acide. Au repos, le liquide incolore et visqueux des urnes de *Nepenthes* est neutre. Quand l'urne est excitée mécaniquement ou par la chute d'un insecte, le suc devient acide, il prend une odeur de miel et une couleur d'ambre due à une substance tannique. Il est alors capable de digérer les petits fragments d'albumine qu'on y projette, mais chose curieuse, il est impossible de mettre en évidence, dans le liquide des urnes, les produits habituels de transformation de l'albumine, tant ceux-ci seraient rapidement absorbés.

Dans des expériences *in vitro* faites avec le suc des urnes ou avec des macérés glycerinés de celles-ci, la *népenthine* n'agit pas en milieu neutre ; elle est sensibilisée par l'acide chlorhydrique. VINES insiste sur ce caractère qui lui fait considérer la *népenthine* comme étant, parmi les protéases végétales, la plus rapprochée, à ce point de vue, de la pepsine. Cette pepsine végétale pousserait la dissolution des protéines jusqu'à formation de leucine, de tyrosine, de tryptophane.

Tout à fait identiques sont les caractères du ferment du *Drosera*.

DARWIN (1) avait observé la digestion de petits cubes d'albumine posés sur les feuilles et tous les phénomènes qui la précèdent ou l'accompagnent (inflexion des tentacules, agrégation protoplasmique). Il avait vu cette digestion s'opérer en milieu acide et il avait constaté le pouvoir antiseptique de la sécrétion.

REES et WILL (2), avec des extraits glycerinés de la plante, avaient obtenu, également en milieu acide, des digestions de fibrine.

En rapportant les phénomènes de digestion par les plantes carnivores à l'intervention des microbes DUBOIS, et TISCHUTKIN avaient rendu nécessaires de nouvelles expériences sur ce sujet. M. EM. LABBÉ (3) a établi qu'il existe bien dans la sécré-

(1) DARWIN. — *Insectivorous Plants*. 1888.

(2) REES et WILL. — *Einige Bemerkungen über fleischende Pflanze*. *Bot. Ztg.* XXXIII, 713, 1875.

(3) EM. LABBÉ. — Du rôle des microorganismes dans les phénomènes

tion du *Drosera* un ferment fibrinolytique, fonctionnant en milieu acide, produisant des peptones en quantité notable, des cristaux de leucine, et des traces de tyrosine, véritable ferment pepsique par les produits qu'il fournit. Il a vu aussi, et c'est le résultat le plus curieux de ses observations, que la sécrétion du *Drosera* étant physiologiquement neutre, celle-ci s'acidifie par fermentation du glucose qu'elle contient sous l'influence de micro-organismes extérieurs.

..*

D. Ferments protéinolytiques des champignons et des microbes.

On rapproche généralement de la trypsine les ferments que sécrètent les différentes espèces et races de levures.

DELBRÜCK (1), puis WILL (2), puis BEIJERINCK (3) avaient vu que les levures attaquent les albumines introduites dans leurs milieux de culture. HAHN et GERET (4) ont montré que le suc de levure agit très activement sur ses substances protéiques propres et même sur des albumines étrangères, comme la fibrine et l'ovalbumine. La protéase de la levûre n'exsude pas en dehors de la cellule, c'est une *endotrypsine* ou *endotryptase* (HAHN et GERET. C'est elle qui, dans l'autodigestion de la levure antérieurement observée par BÉCHAMP, SCHÜTZENBERGER, puis SALKOWSKI, libère, aux dépens des protéiques propres de celle-ci, la leucine, la tyrosine, l'arginine, la lysine, les

de digestion observés chez le *Drosera rotundifolia* L., Thèse Ec. Ph. Paris, 1904.

(1) DELBRÜCK. — *Koch. Jahresb.*, 139, 1893.

(2) WILL. — *Z. gesamt. Brauw.*, XXI, 139, 1898.

(3) BEIJERINCK. — Weitere Beobachtungen über die Octoporushefe, *Ctb. Bakt.*, 2^e P., III, 521, 1897.

(4) HAHN. — Das proteolytische Enzym des Hefepresssaftes, *Ber. chem. Ges.*, XXXI, 200, 1898. — L. GERET et HAHN. — Zum Nachweis des im Hefepresssaft enthaltenes proteolytisches Enzym, *id.*, XXXI, 202, 1898, et: Weitere Mittheilungen über das im Hefepresssaft enthaltene proteolytische Enzyme, *id.*, XXXI, 2.335, 1898.

acides aspartique et glutamique, le tryptophane, etc. (SCHÜTZENBERGER (1), KUTSCHER (2), SCHÜTZ (3).

Cette endotryptase ne peut pourtant être donnée comme identique à la trypsine pancréatique, car elle a son optimum d'action à une acidité de 0,2 % en HCl. Elle diminue d'activité à la neutralité et n'agit plus à une faible alcalinité.

Au reste, elle ne paraît pas seule présente dans le suc de levure. BOKORNY (4) observe que ce suc, additionné de 1,5 % d'acide phosphorique, produit abondamment des peptones aux dépens de la poudre de viande, et conclut, un peu précipitamment, à l'existence d'une pepsine.

VINES (5), d'autre part, paraît avoir isolé de la levure une érepsine, soluble dans l'eau, et une trypsine, insoluble dans l'eau pure, mais facilement soluble dans l'eau chlorurée.

La tryptase de la levure n'est pas un ferment unique, mais un mélange de protéases ; il n'est certes pas facile de les dissocier, mais il n'est pas plus légitime de les réunir sous un nom commun qu'il ne le serait de réunir sous une même appellation les ferments hydrolysants des divers saccharides que que cette même levure renferme.

*
* *

On a rencontré des protéases chez tous les champignons chez les Myxomycètes (PINOY (6), les Moisissures (HANSEN (7), WEHMER (8), BOURQUELOT (9), MALFITANO, BUTKEWITSCH (10),

(1) SCHÜTZENBERGER. — Recherches sur la levûre de bière. *Bull. Soc. chim.*, [N.S.], XXI, 204, 1874.

(2) KUTSCHER. — Chemische Untersuchungen über die Selbstgährung der Hefe. *Z. ph. Ch.*, XXXII, 59, 1901, et Ueber das Hefetrypsin, *id.*, 419, 1901.

(3) J. SCHÜTZ. — Zur Kenntnis des proteolytischen Enzyms der Hefe. *Hofm. Beitr.*, III, 433, 1903.

(4) BOKORNY. — D'ap. *Bot. Ctb.*, XIII, 235, 1903.

(5) VINES. — *Loc. cit.*, XVIII, 289, 1904, et XXIII, 1, 1909.

(6) PINOY. — Amibo-diastrases des Acrasiées. *C.R. Biol.* LVIII, 769, 1905.

(7) HANSEN. — *Flora*, LXXII, 88, 1889.

(8) WEHMER. — *Aspergillus Wentii* eine neue technische Pilzart Javas. *Ctb. f. Bakt.*, [2^e P.], II, 1896.

(9) BOURQUELOT. — Les ferments solubles de l'*Aspergillus niger*. *Bull. Soc. Myc.*, IX, 230, 1893.

(10) Indic. bibliog. plus loin.

SARTORY (1), les Basidiomycètes (HJORT (2), BOURQUELOT et HÉRISSEY (3), FERMI et BUSCAGLIONI (4), etc.).

On reste, en vérité, très embarrassé lorsque l'on tente de répartir, dans le cadre qui leur appartient, toutes ces protéases.

En cette place, il faut signaler l'érepsine découverte chez les champignons Basidiomycètes par MM. DELEZENNE et MOUTON (5), et réserver une brève étude à la protéase de l'*Aspergillus niger* qu'a étudiée M. MALFITANO (6).

La diastase de l'*Aspergillus* qui exsude dans le milieu de culture, surtout quand la Mucédinée atteint sa complète maturité, s'obtient le plus commodément en faisant macérer le mycélium récolté au moment de la sporulation et rapidement séché, et précipitant par l'alcool le liquide de macération. M. MALFITANO désigne la diastase sous le seul nom de protéase, ce qui a l'incomparable avantage de ne pas préjuger de son identité possible avec une des diastases protéolytiques connues et de ne pas affirmer d'un mot qu'elle est simple ou multiple.

Examinons donc en bloc les propriétés de cette protéase. Voici d'abord les substances qu'elle attaque : elle peptonise la sérum-albumine, mais elle ne digère ni l'ovalbumine coagulée, ni la fibrine cuite; elle caseïtise puis digère la caseïne, elle liquéfie la gélatine, et la transforme en produits plus simples non gélatinisables.

Son activité s'exerce le mieux aux environs de 40° ; la diastase est détruite si on la chauffe pendant quelques heures à 70°. La protéase est active déjà en milieu neutre au tournesol, mais son optimum d'activité se place à une légère acidité au tournesol, correspondant encore à la neutralité au méthylorange. Les alcalis arrêtent brusquement son action.

Quand l'on compare la protéase de l'*Aspergillus* avec les fer-

(1) Indic. bibliog. plus loin.

(2) HJORT. — D'ap. *Cib. f. Physiol.*, X, 192, 1896.

(3) BOURQUELOT et HÉRISSEY. — V. plus loin, chapitre Caséase.

(4) FERMI et BUSCAGLIONI. — Die proteolytischen Enzyme im Pflanzenreiche. *Cib. f. Bakt.*, [2^e P.], v. 63, 1899.

(5) DELEZENNE et MOUTON. — Sur la présence d'une érepsine dans les champignons Basidiomycètes. *C. R. Biologie*, LV, 325, 1903.

(6) MALFITANO. — La protéolyse chez l'*Aspergillus niger*. *A. I. P.*, XIV, 60, 1900. — Sur la protéase de l'*Aspergillus niger*. *Id.*, XIV, 420, 1900.

ments protéolytiques les mieux connus — et cette comparaison a été soigneusement faite par M. MALFITANO, — on voit qu'elle manifeste les liens de parenté les plus réels avec la papaïne, sans se confondre avec elle, car elle est beaucoup plus sensible à l'alcalinité et agit dans une zone de température tout à fait différente.

Ce dernier point serait peut-être à reprendre à la lumière des notions nouvelles que nous possédons sur la papaïne. La protéase de l'*Aspergillus* ne saurait être confondue avec la pepsine qui agit en présence d'acide libre et possède en plus le pouvoir de décoaguler l'albumine; elle est également bien distincte de la trypsine qui agit en présence de phosphates alcalins et attaque l'albumine coagulée. La protéase de l'*Aspergillus* a donc sa physionomie propre.

*
* *

Il existe assurément un très grand nombre de protéases microbiennes.

Parmi les espèces sécrétrices de diastases protéolytiques, il faut citer en première ligne les bactéries de la putréfaction, espèces surtout anaérobies comme l'avait soutenu PASTEUR, et comme l'a plus tard établi BIENSTOCK. Ces microbes de la putréfaction se répartissent, au point de vue qui nous intéresse ici, en deux groupes, suivant qu'ils sont capables d'attaquer les substances protéiques naturelles ou seulement leurs produits de décomposition, les protéoses; ce sont des ferments figurés « protéolytiques » ou seulement « peptolytiques ». Leurs diastases sont alors elles-mêmes protéolytiques ou seulement peptolytiques.

Ces diastases microbiennes de la putréfaction n'ont pas été étudiées de façon très approfondie. Signalons pourtant l'intéressant travail de M. MARTELLY.

Cet auteur a groupé les microbes de la putréfaction de la viande d'après la nature des substances qu'ils attaquent, et d'après leur ordre d'apparition au cours de la putréfaction. Pour plusieurs espèces, *Staphylococcus pyogenes albus*, *Bacillus putrificus*, *Bacillus gracilis putidus* T. et M., etc., il a

isolé les diastases du milieu de culture filtré et additionné de glycérine, en les entraînant dans un précipité de phosphate de chaux.

Dans quelques cas, la fibrine fixant ce ferment soluble, il a isolé celui-ci en agitant le résidu fibrineux avec de l'éther.

D'une comparaison, que l'on souhaiterait plus complète, avec les diastases de la digestion, MARTELLY (1) conclut que ces diastases microbiennes se rattachent au type trypsine ; il n'existe pas dans les putréfactions ordinaires d'espèces sécrétant une diastase du type pepsique. C'est dire que ces diastases agissent en milieu neutre ou alcalin et qu'elles démolissent la molécule protéique avec formation d'acides aminés, leucine, tyrosine. Quant aux produits spéciaux des fermentations putrides, hydrogène sulfuré, anhydride carbonique, indol, phénols, acides gras et aromatiques, ammoniac, amines, etc., ils ne résultent pas de l'action des ferments protéolytiques ; ils sont dus à la vie propre des bactéries, ou peut-être les diastases qui les produisent sont-elles des diastases intracellulaires différentes des protéases.

La protéase de la bactérie charbonneuse étudiée par M. MALFITANO hydrolyse la sérumalbumine et l'ovalbumine. RIETSCH (2) a, par précipitation alcoolique, isolé des liquides de culture du vibron cholérique et du staphylocoque doré une poudre fermentaire digérant la fibrine.

C'est également à des diastases plus ou moins voisines de la trypsine que l'on a attribué la liquéfaction de la gélatine et la digestion de la caséine. Je dirai plus loin ce qu'il faut, à mon sens, penser de cette assimilation.

*
* *

Comment classer les protéases végétales ?

Après le coup d'œil d'ensemble que nous venons de jeter sur les mieux connues des diastases protéolytiques des plantes

(1) MARTELLY. — La digestion animale et la putréfaction. *Thèse Doct. Univ. Ph.*, Paris, 1902.

(2) RIETSCH. — Contribution à l'étude des ferments digestifs sécrétés par les bactéries. *J. Ph. Ch.*, XVI, 8, 1887.

et des microbes, nous voudrions pouvoir faire la synthèse des faits, rapprocher ces diastases de façon à les grouper en quelque sorte en familles naturelles. C'est pour l'instant tâche à peu près impossible.

J'ai dit, au début de ce chapitre, que deux tentatives en ce sens ont été faites, et ce sont elles que je résume ici.

VINES (1) observe d'abord qu'il faut distinguer dans la protéolyse deux phénomènes : la *peptonisation* ou transformation de la protéine en peptones, et la *peptolyse* ou transformation des peptones en acides aminés.

La pepsine, dit-il, est une diastase peptonisante et non peptolytique.

La trypsine est fortement peptonisante et faiblement peptolytique.

L'érepsine est essentiellement peptolytique.

Chez les plantes, on trouve des diastases peptolysantes, ce sont des *éreptases*. On trouve d'autre part des diastases peptonisantes, ce sont des *peptases*. Il observe avec raison que ces dernières fonctionnent toujours en milieu acide et à ce titre se rapprochent de la pepsine d'où leur nom générique de peptases.

Il y a d'ailleurs des degrés dans leur sensibilité aux acides, et, à ce point de vue, VINES les groupe dans l'ordre suivant :

Très près de la pepsine, la népenthine qui ne fonctionne qu'en milieu acide, — puis les protéases qui agissent en milieu acide, neutre, ou même alcalin, mais mieux en milieu acide (broméline, papaïne, peptase d'orge), — puis celles qui sont actives aussi bien à la neutralité qu'à l'acidité, telle l'endoprotéase de la levure, — celles enfin qui exercent leur activité en milieu neutre ou alcalin, et se rapprochent le plus de la trypsine animale, telles seraient les protéases des bactéries de la putréfaction.

Pour VINES, ce que l'on désigne sous le nom *trypsine végétale*, c'est l'association, qui serait très générale, d'une peptase et d'une éreptase. VINES trouve cette association dans la levure, les champignons, les phanérogames. La papaïne elle-

(1) Différentes publications citées.

même résulterait de l'association de ces deux diastases 1). DEAN (2) note des faits analogues et nous avons vu que VINES est parvenu à séparer, dans quelques cas, la peptase de l'éreptase.

Il n'existerait donc pas chez les plantes de véritable trypsine, c'est-à-dire de diastase à la fois peptonisante et peptolytique agissant en milieu neutre ou faiblement alcalin.

Je crois volontiers, pour ma part, que l'expression de « trypsine végétale » n'est pas heureuse et doit être rejetée. Dans l'histoire d'un ferment soluble, le fait qui doit, après la nature de la substance qu'il attaque, passer au premier plan, c'est la nature de sa complémentaire active, acide, alcali, base terreuse, oxyde métallique, etc. Le terme des réactions qu'il provoque serait sans doute un critérium de très grande valeur, si nous étions sûrs d'avoir affaire dans nos expériences à un ferment unique et non à un mélange, or ce dernier cas est certainement le cas général, et nous observons des actions qui se superposent, non des actions simples.

*
* *

La méthode de classification sur laquelle ABDERHALDEN et ses collaborateurs (3) ont appelé l'attention, méthode basée sur

(1) VINES. — *Loc. cit.* et The proteases of plants (VI). *Ann. of Botany.*, XXIII, 1, 1909.

(2) DEAN. — On proteolytic enzymes. *Bot. Gaz.*, XXXIX, 321, 1905 et XL, 121, 1905.

(3) E. ABDERHALDEN et A. TERUUCHI. — Vergleichende Untersuchungen über einige proteolytische Fermente pflanzlicher Herkunft. *Z. ph. Ch.*, XLIX, 26, 1906.

E. ABDERHALDEN et A. SCHITTENHELM. — Die Wirkung der proteolytischen Fermente keimender Samen des Weizens und der Lupinen auf Polypeptide. *Z. ph. Ch.*, XLIX, 26, 1906.

E. ABDERHALDEN et KÖELKER. — Die Verwendung optisch-aktiver Polypeptide zur Prüfung der Wirksamkeit proteolytischer Fermente. *Z. ph. Ch.*, LI, 294, 1907. Weiterer Beitrag zur Kenntnis des Verlaufs der fermentativen Polypeptidspaltung unter verschiedenen Bedingungen. *Z. ph. Ch.*, LIV, 363, 1907-08. — Weiterer Beitrag zur Kenntnis des Verlaufs der fermentativen Polypeptidspaltung. *Z. ph. Ch.*, LV, 417, 1908.

E. ABDERHALDEN et L. MICHAELIS. — Der Verlauf der fermentativen Polypeptidspaltung. *Z. ph. Ch.*, LII, 326, 1907.

l'action que les ferments protéolytiques exercent sur les peptides artificiels, est susceptible de fournir de très précieuses données.

L'intérêt de ces données repose sur ce fait que les polypeptides artificiels ne sont pas indifféremment dédoublés par toutes les protéases et que l'intensité du dédoublement varie avec les diastases envisagées.

Voici quelques exemples :

La glycyl-l-tyrosine — dont l'emploi est particulièrement avantageux par suite de la facile séparation des constituants — est dédoublée par la papaïne et par le suc d'expression de la levure de bière, tandis qu'elle résiste au suc des urnes de Népenthes.

La d-alanyl-d-alanine est énergiquement attaquée par le suc d'expression de la levure, tandis qu'elle l'est médiocrement par le suc pancréatique, même kinasé.

La glycyl-glycine, la d-l-leucyl-glycine, la dialanyl-cystine sont attaquées par le suc d'expression des graines de lupin et de froment, et par le suc de levure.

La d-l-alanyl-glycine, la diglycyl-glycine, la d-l-leucyl-glycine sont dédoublées par le suc d'expression de *Psalliotia campestris*.

Il faudra évidemment multiplier les observations pour arriver à l'énoncé de lois générales.

ABDERHALDEN et SCHITTENHELM ont vu, pour ces diastases comme pour la trypsine, que, dans le cas des peptides racémiques, le dédoublement est asymétrique, et les acides aminés mis en liberté identiques à ceux que l'on rencontre dans les protéiques naturels.

Les acides aminés naturels et optiquement actifs retardent le dédoublement des peptides mis en digestion. Ainsi le dédou-

E. ABDERHALDEN et A. GIGON. — Weiterer Beitrag zur Kenntnis der Verlaufs der fermentativen Polypeptidspaltung. *Z. ph. Ch.*, LIII, 251, 1907.

E. ABDERHALDEN et A. RILLIET. — Über die Spaltung einiger Polypeptide durch den Presssaft von *Psalliotia campestris*. *Z. ph. Ch.*, LV, 395, 1908.

blement de la glycyl-l-tyrosine par le suc de levure est retardé quand on ajoute au mélange de la d-alanine, de la l-valine, de la l-leucine, de la l-sérine, du d-tryptophane, etc. Le glycocolle qui est inactif ne retarde pas. La l-alanine, la d-leucine, antipodes optiques des acides aminés naturels, sont sans action.

La l-tyrosine, l'un des termes du dédoublement de la glycyl-l-tyrosine, retarde énergiquement le dédoublement du peptide, mais dès que la tyrosine en cristallisant sort du champ de la réaction, on constate une reprise d'activité dans le dédoublement du peptide.

Ces faits, par leur portée générale, débordent un peu le plan de la question qui devait terminer ce chapitre.

Au point de vue général, ils confirment l'idée émise par FISCHER des rapports de configuration qui doivent exister entre les diastases et les corps qu'elles transforment. Au point de vue physiologique, ils laissent à penser que, *in vivo*, l'allure des réactions diastasiques est différente de ce qu'elle est *in vitro*, par suite de l'absorption continue des produits de dédoublement.

Il faudra accumuler les faits pour que la méthode permette le classement rationnel des protéases végétales et leur identification rapide. Enfin, il faut bien remarquer que, pour excellente qu'elle soit, elle ne saurait répondre à tous les besoins : elle s'applique aux diastases hydrolysantes des peptides, aux diastases peptolytiques ; elle ne saurait s'appliquer aux diastases peptonisantes dont l'action porte sur les protéiques naturels et ne conduit pas leur désagrégation jusqu'à la formation d'acides aminés cristallisables.

CHAPITRE VII.

Appendice à l'étude des ferments des protéines.

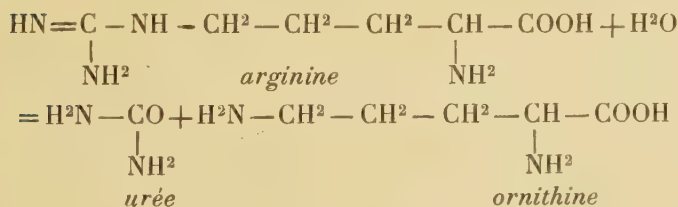
L'ARGINASE.

La diastase à laquelle je consacre ici une brève étude n'est pas, à proprement parler, une diastase protéinolytique. Mais comme elle décompose l'un des termes les plus importants de l'hydrolyse des protéiques par les précédentes diastases, comme l'équation de ce dédoublement est simple, comme son importance physiologique est considérable, elle vient en sa place à la suite des ferments des protéines.

*
* *

KOSSEL et DAKIN (1), à l'occasion d'une étude relative à l'action de l'érépsine sur la clupéine, ont découvert l'arginase. Cette diastase fixe une molécule d'eau sur l'arginine et la scinde en ornithine et urée.

Voici l'équation de la réaction :



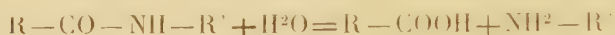
(1) KOSSEL et DAKIN. — *Über die Arginase. Z. ph. Ch.*, XLI, 321 1904.

Souligner la mise en liberté d'urée suffit pour montrer l'intérêt physiologique de cette réaction. Au point de vue chimique, il est intéressant de la comparer à celles que provoquent les ferments protéinolytiques ou peptolytiques.

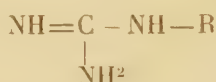
Ceux-ci fixent une molécule d'eau sur les groupements



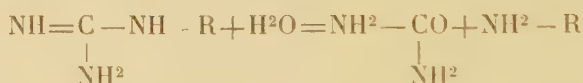
qui résultent de la soudure des amino-acides



L'arginase fixe H^2O sur le groupement



d'où résultent



et le seul rapprochement de ces formules, montrant en quoi ces réactions diffèrent, explique qu'elles peuvent être le fait de diastases différentes.

L'arginase a été découverte dans un extrait de muqueuse intestinale, mais cet organe est relativement pauvre en cette diastase. Le foie renferme au contraire une arginase très active. Ce fait éclaire des expériences déjà anciennes de M. Ch. RICHET (1). Ce savant avait vu que le foie extrait du corps et abandonné à lui-même continue à fabriquer de l'urée et cela « probablement, disait-il, par un phénomène d'hydratation dû à une diastase soluble. »

KOSSEL et DAKIN (2) ont encore trouvé l'arginase dans les

(2) CHARLES RICHET. — De la formation d'urée dans le foie après la mort. *C. R.*, 1125, 1894.

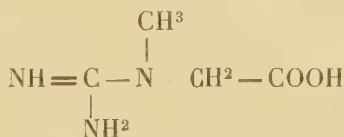
(1) KOSSEL et DAKIN. — Weitere Untersuchungen über fermentative Harnstoffbildung. *Z. ph. Ch.*, XLII, 181, 1904.

reins, le thymus, les glandes lymphatiques ; elle est peu abondante dans le muscle ; il y a doute sur sa présence dans le sang, la bile, les capsules surrénales ; elle est absente du suc pancréatique et de la rate.

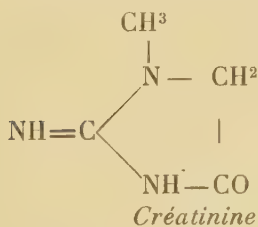
SHIGA (1) a trouvé l'arginase dans la levure, JALOUSTRE (2) dans l'*Aspergillus niger*.

KOSSEL et DAKIN la préparent ainsi : on coupe un foie de chien en fragments, on le broie avec du sable et on le presse de façon à obtenir 45 % de suc. Ce suc est aussitôt additionné de deux volumes d'alcool et d'un volume d'éther ; il se fait un précipité qu'on lave à l'éther et qu'on sèche dans l'exsiccateur à acide sulfurique. 200 grammes de foie produisent ainsi 5 grammes d'une poudre incomplètement soluble dans l'eau, dédoublant rapidement l'arginine et conservant son activité plus de deux mois. On peut également employer le sulfate d'ammoniaque pour précipiter la diastase.

DAKIN (3) s'est demandé si l'arginase agit sur d'autres substances que l'arginine, sur la guanidine elle-même et sur d'autres dérivés de la guanidine. Les résultats ont été négatifs. L'arginase n'agit pas sur la créatine et sur la créatinine malgré leur analogie de constitution avec l'arginine.



créatine



Créatinine

(1) SHIGA. — Ueber einige Hefefermerte. *Z. ph. Ch.*, XLII. 502, 1904.

(2) JALOUSTRE. — Recherche de l'arginase chez l'*Aspergillus niger* *Mémoire Dipl. d'études sup.*, Paris, 1908.

(3) DAKIN. — The action of arginase upon Creatin and other Guanidin derivatives. *J. of biolog. Chem.*, III, 435, 1907.

L'arginase ne se confond donc pas avec la *créatinase* et la *créatininase* de GOTTLIEB et STANGASSINGER (1).

Pourtant il semble que l'arginase ne porte pas seulement son action sur l'arginine libre. Elle atteindrait aussi tout complexe renfermant de l'arginine, c'est-à-dire les protéiques en général.

Des groupements arginine elle détacherait le groupement urée, laissant fixée à la molécule protéique, le seul groupement ornithine. Le fait n'a pas été démontré directement ; il découle d'observations de KOSSEL et DAKIN relatives à la constitution d'une clupéone obtenue par hydrolyse diastasique. Cette clupéone ne donne plus d'arginine par hydrolyse acide, mais seulement de l'ornithine. Le mélange diastasique extrait intestinal, aurait éliminé le groupement urée et aurait laissé en place l'ornithine.

Cette démonstration est évidemment insuffisante et il faut en attendre une plus complète. Mais l'hypothèse est très séduisante ; elle imagine un processus nouveau de formation de l'urée dans les organismes ; pour cette seule raison, l'arginase méritait d'être citée ici et, si l'hypothèse se vérifie, cette diastase aura droit à une place de premier plan dans l'histoire des ferments protéolytiques.

(1) GOTTLIEB et STANGASSINGER.— Uber das Verhalten des Kreatins bei der Autolyse. *Z. ph. Ch.*, LII, 1, 1907.

DEUXIÈME PARTIE.

Ferments des Protéïdes.

Nous avons étudié la pepsine, la trypsine, la papaïne, l'érepsine, l'arginase, diastases qui attaquent les substances protéïques proprement dites, leurs produits intermédiaires de transformations, protéoses et peptides, l'un de leurs produits ultimes de décomposition, l'arginine.

Doivent trouver place, dans cette deuxième partie, les diastases qui s'adressent aux substances protéïques groupées sous le nom de *protéïdes*.

*
* *

Nous étudierons d'abord les diastases qui hydrolysent les protéïdes si improprement désignés sous le nom de *nucléalbumines* ou de *paranucléoprotéïdes*.

CHAPITRE VIII.

FERMENTS

des

PARANUCLÉOPROTÉIDES

§ 1. *Présure envisagée comme ferment protéolytique.*

On désigne sous le nom de *présure* ou *ferment-lab* le ferment qui « caséifie » le lait.

Cette définition légitime-t-elle le classement de la présure parmi les ferments protéolytiques ? Pour nous en assurer, attachons nous dès maintenant à définir ce qu'il faut entendre par ce mot de « caséification ».

Lorsqu'on additionne du lait d'une solution de présure — commercialement on désigne sous le nom de présure une macération de caillette de veau ou de chevreau dans de l'eau salée — on voit le lait qui coagule ; au bout d'un temps d'autant plus court que la force de la présure est plus grande et que la température du mélange est plus proche de la température favorable à la réaction diastasique, le lait se prend en une masse adhérente aux parois du vase, si bien qu'on peut retourner celui-ci sans qu'il s'écoule une goutte de liquide. Puis cette masse se rétracte, il en exsude un liquide clair, un sérum, le *lacto-sérum*, qui baigne un véritable caillot, le *caseum*.

Le phénomène est, au moins en apparence, en tout comparable à ce qui se passe, lorsque du sang, sorti des vaisseaux, coagule.

Le fait est connu depuis les temps les plus reculés et il est la base d'une industrie importante, celle des fromages.

C'est HAMMARSTEN (1) qui a rapporté la transformation subie par le lait à une diastase, la *chymosine* ou *lab-ferment*. En France nous disons *présure*, et je ne vois point de bonne raison pour renoncer, comme le font beaucoup d'auteurs, à cette expression. C'est HAMMARSTEN également, qui a reconnu que la substance atteinte par la diastase est la caséine du lait.

Quelle transformation subit donc la caséine de la part de la présure ?

Ici nous trouvons deux théories: l'une, celle du dédoublement, qui est la première en date, formulée avec quelque réserve par HAMMARSTEN lui-même puis reprise et développée par ARTHUS et PAGÈS (2); l'autre, celle de la coagulation, dont DUCLAUX (3) s'est fait le défenseur.

Si séduisante que soit une théorie, elle ne saurait avoir chance de subsister que si elle repose sur des faits expérimentaux indiscutés. Or les faits sont en faveur de la première. Laissons donc parler l'expérience.

Voici de la caséine (4) pure, préparée selon la méthode d'HAMMARSTEN en la précipitant au moyen de l'acide acétique de lait étendu d'eau, la recueillant et la soumettant à une série de redissolutions dans la soude ou l'ammoniaque et de reprécipitations par l'acide acétique, puis à un lavage à l'éther pour éliminer la matière grasse.

Cette caséine est un protéide, peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans les solutions d'alcalis ou de bases alcalino-terreuses, soluble dans les solutions étendues de chlorure de sodium. Elle est précipitée de ses dissolutions par Q. S. de sulfate de magnésium (3 c³ de solution saturée de sulfate de magnésium pour 10 c³ de solution de caséinate de soude à 4⁰/₀); elle est précipitée par les acides; elle n'est pas coagulée par la chaleur.

(1) HAMMARSTEN. — Zur Kenntniss des Kaseins und der Wirkung des Labferments. *Z. ph. Ch.*, VII, 1883.

(2) ARTHUS et PAGÈS. — Recherches sur l'action du lab et la coagulation du lait. *Arch. de Physiologie*, II, 331, 1890. -- Recherches sur le lab-ferment de la digestion du lait. *Id.*, 540, 1890.

(3) DUCLAUX. — Traité de Microbiologie, II, 281.

(4) On dit plutôt, aujourd'hui, caséinogène et le nom de caséine reste réservé à l'un des produits de dédoublement du caséinogène, celui qui coagule.

Faisons dissoudre cette caséine dans une petite quantité d'eau de chaux et additionnons la liqueur opalescente de la quantité d'acide phosphorique étendu, juste suffisante pour donner avec la chaux une solution neutre à la phthaléine.

On obtient dans ces conditions une liqueur d'un blanc laiteux qui, additionnée de présure, coagule en un gâteau solide, un caseum analogue à celui du lait caséifié, d'où se sépare un liquide analogue au lacto-sérum. Dans le liquide, on trouve une substance protéique non coagulable par la chaleur et non précipitable par les acides.

Faisons à nouveau cette expérience, mais en remplaçant la solution phosphocalcique par une solution phosphosodique de caséine.

La présure ne provoque ici aucun phénomène apparent ; il ne se fait pas de caseum. La caséine pourtant a été modifiée par la diastase. Voulons-nous la régénérer par précipitation acide, nous n'obtenons jamais la totalité de la substance mise en œuvre, une partie reste en dissolution et la substance que l'acide a précipitée n'est plus de la caséine : ses solutions sont coagulables par la chaleur, elle est précipitée par de très petites quantités d'un sel soluble de calcium.

Voici les faits indépendants de toute théorie. On les résumera en disant que, sous l'influence de la présure, la caséine s'est *dédoublée* en deux corps : la *paracaséine*, qui, en présence de sels de calcium, se précipite en produisant le *caseum*, et la *lacto-sérum-protéose* (ARTHUR : *Molkeneiweiss* d'HAMMARSTEN), protéine incoagulable par la chaleur, les acides et les sels de calcium.

La présure n'exige pas la présence de sels de chaux pour être active. Le phénomène de caésification témoigne que la diastase a agi, mais elle n'est qu'un phénomène surajouté, accidentel en quelque sorte, et qui ne doit pas faire perdre de vue le phénomène primitif qui est un phénomène d'hydrolyse. Ainsi la théorie du dedoublement découle logiquement des faits d'expérience. La présure est une diastase *protéolytique* et sa place est bien marquée ici.

Pour DUCLAUX, il n'y a pas dans la caséification de dedoublement préalable de la caséine. La caséine subit, sous l'influence

combinée des sels de chaux et de la présure, un changement d'état physique, une coagulation. La présure n'est en aucune façon protéolytique, mais seulement coagulante

On trouvera, dans le « Traité de Microbiologie » les objections qu'élève ce savant contre la théorie du dédoublement. A la base de ces objections, il y a une expérience : du lait, et le même lait coagulé par le lab, filtrés tous les deux sur bougie de porcelaine, fournissent deux liquides ayant exactement la même composition. On devrait, si ce que nous avons dit est exact, trouver plus d'albumine dans le liquide fourni par le lait présuré que dans le liquide fourni par le lait normal.

Je ne sais si l'expérience de DUCLAUX a été reprise, mais ce que je sais bien, c'est que les expériences dont j'ai tout à l'heure donné le schéma le plus démonstratif ont été faites sous des formes variées et que les résultats en ont été constants.

*
* *

Comme le phénomène le plus évident, le plus facilement observable, est la *caséification*, c'est lui qui a suscité le plus grand nombre de travaux ; sur lui sont basées les *méthodes de recherche et de caractérisation* du ferment, les *méthodes de mesure* de son activité ; on a minutieusement étudié l'influence qu'exerce sur la caséification, la présence des différents *acides* et *sels*. D'autre part, les applications de la présure — d'ailleurs plus industrielles que pharmaceutiques — ont le même fait pour raison d'être.

Je n'étudierai pas ici la caséification qui nécessiterait de très longs développements et qui dépasse un peu l'objet propre de ce mémoire. Il importait seulement de marquer la place de la présure parmi les ferments protéolytiques, comme nous avons marqué celle de la plasmase.

La notice ci-dessous sera donc intentionnellement très courte et visera seulement quelques faits particuliers (1).

(1) E. LAQUEUR a donné une bonne revue avec bibliographie (jusqu'en 1905) des travaux relatifs à la présure. *Bioch. Ctb.*, IV, 333, 1905-06.

La présure est sécrétée par l'estomac des Mammifères jeunes en lactation. On la trouve dans leur suc gastrique et dans les macérés de muqueuse stomacale.

Elle est également sécrétée par les glandes gastriques des Mammifères adultes à la suite d'ingestion de lait ARTHUS (1).

On la trouve dans le pancréas et le suc pancréatique. M. DELEZENNE (2) a observé qu'un suc pancréatique inactif soumis à l'action du calcium, acquiert au bout d'un certain temps et d'une façon brusque, la propriété de coaguler le lait. Le calcium, est un activateur rigoureusement spécifique du lab comme il l'est de la trypsine.

On a trouvé la présure dans un grand nombre d'organes ; on l'a rencontrée dans les liquides d'autolyse aseptique de l'estomac et du pancréas et aussi dans les liquides d'autolyse du foie, du poumon, du cerveau, des muscles, du rein, de l'ovaire, etc.

On l'a signalée dans les sécrétions digestives des Oiseaux, Reptiles, Batraciens, Poissons et aussi dans celles de certains Invertébrés : Spongiaires (COTTE) (3), Actinies (MESNIL) (4), Crustacés, Mollusques, Céphalopodes, Annélides (J. SELLIER) (5), Tuniciers (GERBER et DAUMÉZON) (6).

Beaucoup de plantes possèdent la propriété de coaguler le

(1) ARTHUS.— Un exemple de l'activité spécifique de la muqueuse gastrique ; du pouvoir labogénique du lait. *C. R. Biol.*, LV, 795, 1903.

(2) C. DELEZENNE.— Formation d'un ferment lab dans le suc pancréatique soumis à l'action des sels de calcium. *C. R. Biol.*, LXIII, 98, 1907. — Sur la formation du lab pancréatique. Spécificité du calcium. *C. R. Biologie*, LXIII, 187, 1907.

(3) COTTE.— Notes sur les diastases de *Suberites domuncula*. *C. R. Biologie*, 1901.

(4) MESNIL.— Recherches sur la digestion intracellulaire et les diastases des Actinies. *A. I. P.*, XV, 384, 1901.

(5) SELLIER.— Existence de la présure dans le suc digestif des Crustacés. *C. R. Biologie*, LVIII, 449, 1906. — Existence de la présure chez les Invertébrés (*Aphrodite aculeata*), *id.*, LVIII, 693, 1906.

(6) GERBER et DAUMÉZON.— La présure des Ascidies. *C. R. Biologie*, LXVI, 193, 1909.

lait (Faits signalés par DARWIN, BOUCHARDAT et QUEVENNE, BAGINSKI, LEA, GREEN, MARLOTH, BOULANGER, DUCLAUX, MALFITANO, etc.) (1).

J'ai établi (2), par des expériences précises, l'existence de la présure végétale et sa très vaste répartition.

Sous le nom de *Sycochymase*, MM. CHODAT et ROUGE (3) ont étudié le ferment lab des rameaux du figuier.

Les présures empruntées à des sources si différentes ne sont pas identiques. La présure des plantes est distincte du ferment lab des animaux. MORGENROTH (4) l'a établi par la méthode des anticorps, pour la cynarase (présure d'artichaut) et, moi-même, pour la présure de l'ivraie et celle de la luzerne.

La présure du figuier (CHODAT et ROUGE, celle du pastel (GERBER), sont très différentes du ferment lab des animaux par leur température optima d'activité, comprise entre 75 et 85° et par ce fait qu'elles coagulent mieux le lait bouilli que le lait cru.

Les présures animales ne sont pas identiques entre elles. Sous le nom de *parachymosine*, I. BANG (5) désigne la présure de l'estomac de porc (c'est la présure des pepsines pharmaceutiques), que divers caractères éloignent de la présure des ruminants.

Les présures végétales ne sont pas davantage semblables entre elles. Par l'étude systématique d'un grand nombre de présures végétales, par l'étude de l'influence que les sels exercent sur le phénomène de coagulation, M. GERBER a pu distinguer plusieurs types d'action présurante (6).

(1) Voir Thèse ci-après signalée.

(2) M. JAVILLIER. — Contribution à l'étude de la présure chez les végétaux. *Thèse Ph. Paris*, 1903.

(3) CHODAT et ROUGE. — La sycochymase ou le lab-ferment du *Ficus carica*. *Ctb. f. Bakt.* 2^e p., XVI, 1, 1906.

(4) MORGENROTH. — Ueber den Antikörper der Labenzyme. *Ctb. f. Bakt.*, 1^{re} p., XXVI, 349, 1899. — Zur Kenntniss der Labenzyme und ihrer Antikörper. *Id.*, 2^e p., XXVII, 721, 1900.

(5) I. BANG. — Ueber Parachymosin, ein neues Labferment. *Pflüg. Arch.*, LXXIX, 425, 1900.

(6) G. GERBER. — La présure des Crucifères *C. R.*, CXLV, 92. — La présure des Rubiacées, *id.*, 284. — Les agents de la coagulation du lait

De toutes les présures, la plus étudiée et la plus importante au point de vue des applications est la présure de veau.

Pour la préparer, on vide les caillettes de jeunes veaux de tous les grumeaux qu'elles renferment, on les lave à grande eau, puis on les gonfle et les conserve pendant quelques semaines dans un endroit aéré. On les coupe alors en petits fragments après avoir séparé la région de l'estomac qui avoisine le pylore, on les fait macérer dans de l'eau légèrement salée (5 %), additionnée ou non d'acide borique.

Après 5 jours de macération, on ajoute encore 5 % de sel marin et on filtre.

Cette présure est naturellement fort impure ; on emploie dans les laboratoires différentes méthodes de purification.

L'industrie prépare aussi des présures en poudre dont la force peut atteindre un taux très élevé 400.000 et même plus.

Cette présure présente son maximum d'activité vers 40° et dans un milieu acide. Elle dédouble, comme nous l'avons vu, la caséine en paracaséine et une protéose, les deux produits de cette réaction étant d'ailleurs fort mal connus. En présence de sels de chaux, dans le lait par exemple ou dans les solutions phospho-calciques de caséine, la paracaséine se sépare sous forme d'une combinaison calcique qui est le caseum. En l'absence des sels de chaux ou si la chaux est insolubilisée à l'état d'oxalate ou de fluorure, la paracaséine reste en solution.

Les deux fragments de la molécule de la caséine qui se trouvent isolés par le lab sont d'ailleurs de grosseur très inégale. Le paracaséine emporte à elle seule plus de 95 % de l'azote de la caséine, moins de 5 % de celui-ci restant engagé sous forme du deuxième produit de dédoublement.

contenus dans le suc du mûrier de Chine, *id.*, 530. Action accélératrice propre du fluorure de sodium sur la coagulation du lait par les présures végétales, *id.*, 689. — Nouvelle méthode de détermination du pouvoir accélérateur des sels neutres de potassium et de sodium, sur la coagulation du lait par les présures végétales, *id.*, 831.

Effet de la dialyse sur les sucs présurants végétaux, *id.*, CXLVIII, 601, 1908. — Fonctionnement des présures aux diverses températures, *id.*, 1320. — Présures basiphiles, *C. R.*, CXLVIII, 56, 1909. — Coagulation du lait cru par la présure du Payayer, *id.*, 497. — Voir aussi *C. R. Biol.*, LXII, 1223, 1225, 1227 ; LXIII, 575, 640, 642, 738 (1907) ; LXIV, 141, 374, 376, 519, 522, 523, 783, 982, 984, 1176, 1178 ; LXV, 180, 182, 537, 539, 708, 739 (1908) ; LXVI, 366 (1909).

C. GERBER et Mlle LEDEBT. — Le chlorure de sodium, sensibilisateur des ferments présurants végétaux. *C. R.*, CXLV, 577, 1907.

Ainsi, lorsqu'on ne considère dans la présure que son activité comme ferment protéolytique, on trouve que celle-ci est en fait bien restreinte si elle se réduit à détacher de la molécule de la caséine un fragment assez petit. Or, de récentes expériences tendent à modifier les notions que nous possédons sur cette question. Elles sont dues à PÉTRY (1). Cet auteur laisse réagir des solutions de lab sur des solutions de caséine exemptes de chaux pendant des temps variables : 1 h., 5 h., 24 h., 48 h., par exemple et il voit que les quantités de paracaséine, loin de rester constantes, diminuent d'une façon lente mais continue. Il est facile de suivre ces variations par la diminution continue du précipité que donnent le chlorure de calcium, la chaleur, etc. En même temps on voit apparaître, dans les mélanges en réaction, des albumoses primaires et secondaires.

Cette hydrolyse suit la loi de SCHÜTZ-BORISSOW et rappelle dans ses grandes lignes l'hydrolyse pepsique.

Il s'agit d'un véritable processus de digestion où l'on voit disparaître peu à peu la paracaséine, sans d'ailleurs qu'il y ait jamais formation de composés simples cristallisables.

Deux objections se présentent d'abord à l'esprit, intervention de microbes, présence de pepsine dans le lab employé. L'auteur a opéré à la température du laboratoire en présence de toluène ou d'essence de moutarde et les observations n'ont jamais duré un temps considérable ; il ne semble pas que les microbes soient en cause ; on aimerait pourtant à trouver dans ce mémoire des expériences faites en milieu rigoureusement aseptique. Quant à la pepsine, il ne semble pas qu'elle soit intervenue. Le lab utilisé ne digère pas le blanc d'œuf coagulé ni la sérum-albumine dissoute, ni la gélatine. Il y a eu pourtant un début de digestion de la sérum-albumine coagulée en tubes de MERT, mais cette digestion était insignifiante en comparaison de celle de la caséine qui se poursuit régulièrement et activement. Cette hydrolyse de la caséine se fait en milieu neutre et même à basse température.

Si la présence, dans le milieu, de sels de calcium a provoqué

(1) PÉTRY. — Über die Einwirkung des Labferments auf Kasein. *Hofm. Beitr.*, VIII, 339, 1906.

le coagulum du paracaséinate, celui-ci n'est pas attaqué en milieu neutre, il l'est au contraire en milieu acide.

On pourrait aussi penser à la présence d'une diastase analogue ou identique à l'érepsine, mais la solution diastasique n'attaque pas les albumoses, la peptone de Witte, par exemple.

L'auteur conclut qu'il y a dans le lab une diastase *spécifique* de la caséine. Mais cette diastase est-elle la présure elle-même, dont le caractère de diastase protéolytique se trouverait alors singulièrement accentué ou s'agit-il d'une diastase existant dans les présures commerciales à côté du lab?

L'auteur trouve qu'il n'y a aucun parallélisme entre la durée de la coagulation et la quantité de protéase produite si bien que l'action coagulante et l'action protéolytique ne paraissent pas liées.

Bien mieux, on peut, par digestion avec du carbonate de soude à 40°, affaiblir et même détruire l'action protéolytique de la présure tout en lui conservant un pouvoir caseifiant assez énergique.

La production de paracaséine et celle de la lacto-sérum-protéose sont peut-être bien le fait de deux diastases différentes et voilà qui remet en question toutes les théories, y compris celle qu'au début de ce chapitre nous avons suivie comme, semblait-il, la plus conforme aux faits.

Les mémoires de SPIRO (1), puis de SLOWTZOFF (2) confirment, sans apporter beaucoup de faits nouveaux, les données de PETRY.

Et je ne vois pas comment ces observations seraient conciliables avec l'opinion des savants qui prétendent faire de la présure et de la pepsine un seul et même ferment.

NENCKI et SIEBER (3) les premiers ont émis cette hypothèse que la molécule de la pepsine est une molécule très complexe et très instable, susceptible de provoquer par ses chaînes laté-

(1) SPIRO. — Beinflussung und Natur des Labungsvorganges. *Hofm. Beitr.*, VIII, 365, 1906.

(2) SLOWTZOFF. — Zur Frage der Labgerinnung der Milch. *Hofm. Beitr.* IX, 149, 1907.

(3) NENCKI et SIEBER. — Beiträge zur Kenntniss des Magensaftes und der chemischen Zusammensetzung der Enzyme. *Z. ph. Ch.*, XXXII, 291, 1901.

rales multiples des réactions variées. En milieu acide, la pepsine intervient par l'un de ses chaînons et digère l'albumine; en milieu neutre, elle provoque, par l'intermédiaire d'un autre groupement, la coagulation du lait. C'est une pure vue de l'esprit. PAWLOW et PARATSCHUK (1), sans entrer dans cette voie, considèrent la digestion des protéines et la caséification comme le fait d'une même diastase; ils basent cette affirmation sur la marche parallèle, des pouvoirs protéolytique et présurant de sucs gastriques, recueillis dans des conditions différentes; ils considèrent d'ailleurs la caséification comme un phénomène synthétique inverse du phénomène analytique de la protéolyse, ces deux actions inverses étant, comme je l'ai dit, le fait d'une même diastase.

Si SAWJALOW (2) n'adopte pas cette dernière interprétation, du moins plaide-t-il aussi la cause de l'identité de la présure et de la pepsine.

Pour lui, comme pour GEWINN (3) qui a dernièrement consacré à cette question un important mémoire, la caséification ne fait que trahir le premier acte de la digestion pepsique — premier acte dont l'allure exceptionnelle avec la caséine tient à ce que l'un des produits de dédoublement de cette substance se coagule sous l'influence des sels de calcium.

De même on a cherché à identifier la présure pancréatique et la trypsine. PAWLOW et PARATSCHUK (4) ont tenté cette assimilation, VERNON (5) également, et M. DELEZENNE, semble-t-il, n'est pas loin de partager cette opinion quand il trouve, dans le calcium un excitant spécifique de la présure pancréatique

(1) PAWLOW et PARATSCHUK. — Über die ein und denselben Eiweissfermente zukommende proteolytische und milchkoagulierende Wirkung verschiedener Verdauungssäfte. *Z. ph. Ch.*, XLII, 415, 1904.

(2) SAWJALOW. — Zur Frage nach der Identität von Pepsin und Chymosin. *Z. ph. Ch.*, XLVI, 307, 1905.

(3) GEWINN. — Pepsin und Chymosin. *Z. ph. Ch.*, LIV, 32, 1907.

Consulter aussi : SAWITSCH. — Zur Frage nach der Identität der milchkoagulirenden und proteolytischen Fermente. *Z. ph. Ch.*, LV, 84, 1908.

(4) *Loc. cit.*

(5) VERNON. — The precipitability of pancreatic fermente by alcohol. *J. of Physiology*, XXIX, 302, 1903.

comme de la trypsine. Pourtant l'assimilation de la présure à la pepsine et à la trypsine est susceptible de sérieuses objections. SCHMIDT-NIELSEN ¹, HEMMETER ², BANG (3), HAMMARSTEN ont défendu la théorie dualistique.

Il me paraît inutile d'entrer dans le détail d'un débat qui n'est pas clos. Je n'ai pas trouvé à la lecture des mémoires d'argument décisif en faveur de la doctrine unitaire, et la facilité de préparer une présure extrêmement active qui ne possède pas d'activité pepsique me paraît, pour l'heure, un argument suffisant pour les séparer.

..

Une propriété assez curieuse et encore mal élucidée du ferment lab est celle qui a été désignée sous le nom de propriété plastéinogène. Elle a été étudiée par DANILEWSKI et ses élèves (4). Elle consiste en ce fait qu'une solution de présure gastrique ajoutée à une solution d'albumose ou de peptone provoque la formation d'un précipité.

Cette propriété n'appartient, d'ailleurs, pas seulement au ferment lab gastrique, mais à la pepsine elle-même, au lab pancréatique (5), à la trypsine et à la papaïne (6). On désigne

(1) SCHMIDT-NIELSEN. — Über die vermeintliche Identität von Pepsin und Chymosin. *Z. ph. Ch.*, XLVIII, 92, 1906.

(2) HEMMETER. — Are the proteolytic and milk coagulating effects of gastric and pancreatic juice due to one and the same enzyme? d'ap. *Bioch. Ctb.*, IV, 615, 1905.

(3) I. BANG. — Sind die proteolytischen und milchkoagulierenden Fermentwirkungen verschiedene Eigenschaften eines und desselben Ferments? *Z. ph. Ch.*, XLIII, 358, 1904.

(4) OKUNEW. — Über die Rolle des Labfermentes bei den Assimilationsprozessen des Organismus. *Diss.*, St-Petersbourg, 1897.

LAWROW. — Über den Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung des Eiweisses. *Diss.*, St-Petersbourg, 1897.

SAWJALOW. — Zur Theorie der Eiweissverdauung. *Diss.*, Jurjew, 1899 et *Pflügers Arch.*, 85, 171, 1901.

(5) DELEZENNE et MOUTON. — Coagulation des solutions concentrées de peptone par le suc pancréatique soumis à l'action des sels de calcium. *C. R. Biologie.* LXIII, 277, 1907.

(6) KURAJEFF. — Über die koagulierende Wirkung des Papayotins au Peptonlösung. *Hofm. Beitr.*, I, 121, 1901. Zur Kenntniss der durch Papa-

ces précipités sous les noms de plastéines et de coaguloses (ce dernier nom est réservé au précipité produit par la papaïne) (KURAJEFF.)

DANILEWSKI et ses élèves ont vu, dans ce phénomène, une régénération d'albumines coagulables aux dépens des produits d'hydrolyse digestive.

H. BAYER (1) a souligné les contradictions entre ces auteurs au sujet de la fraction d'albumine qui donne le précipité de plastéine et, d'après lui, la « substance plastéinogène », loin d'être une albumose, appartient au groupe des polypeptides. Il a isolé de la peptone de Witte, par fractionnement au moyen de l'alcool et de l'éther, une « substance plastéinogène » dont il a étudié la composition et les propriétés.

*
* *

§ 2. Caséase.

Le nom de *caséase* a été donné par DUCLAUX (2) au ferment soluble qui « détruit et liquéfie le coagulum que la présure a formé ». Les microbes producteurs actifs de présure, tels les *Tyrothrix* de DUCLAUX, sont aussi d'actifs producteurs de caséase.

Quand on ajoute à du lait une culture de *Tyrothrix tenuis*, filtrée à la bougie, « ce lait se coagule comme avec la présure de veau, mais en donnant un caillot moins opaque. De plus, ce caillot, au lieu de rester ferme et cohérent, va devenir de plus en plus gélatineux et finira par se résoudre tout entier en un liquide transparent, un peu opalescent encore, ressemblant à du sérum un peu louche ».

Cette liquéfaction est le fait d'une diastase, distincte de la

yotin und Lab erzeugten Albumosenniederschläge, *id.*, II, 441, 1902, et Über das Plastein aus kristallisiertem Ovalbumin und über das Verhalten der Plasteinalbumosen zur Magen- und Dünndarmschleimhaut des Hundes, *id.*, IV, 476, 1903.

(1) H. BAYER. — Ueber die plasteinogene Substanz. *Hofm. Beitr.*, 554, 1903.

(2) DUCLAUX. — Mémoires sur le lait. *Ann. Inst. agron.*, 1882. Le lait, Paris, 1894.

présure ; elle agit à basse température, mais mieux entre 30 et 35°.

Le nombre des microbes capables de coaguler le lait est considérable, mais il faut distinguer ceux qui coagulent le lait par acidification et ceux qui le caséifient par sécrétion d'une présure. Seuls, ces derniers sont capables de peptoniser le caseum. Ils sont, d'ailleurs, d'une très inégale activité.

La *caséase* a été également trouvée chez des Moisissures : *Aspergillus glaucus* et *Penicillium glaucum* (DUCLAUX (1), *Aspergillus niger* (BOURQUELOT et HÉRISSEY (2), MALFITANO (3).

M. BOULLANGER a vu que diverses espèces de levures sont susceptibles de vivre dans le lait, de le coaguler, de liquéfier le coagulum et de décomposer très profondément la caséine, puisque, entre autres produits de destruction de celle-ci, on trouve de l'ammoniaque. On ne saurait d'ailleurs affirmer que cette production d'ammoniaque est bien en relation avec l'action diastasique.

Chez les Champignons supérieurs, l'existence d'un ferment protéohydrolytique a été constatée par MM. BOURQUELOT et HÉRISSEY (4), ferment qui digère la caséine et mérite par conséquent d'être désigné sous le nom de *caséase*. La technique de recherche est la suivante : on traite du lait par un mélange, en proportion convenable, d'éther, d'alcool et d'ammoniaque, de façon à enlever au lait la matière grasse qu'il renferme.

D'autre part, on triture les Champignons avec du sable et de l'eau chloroformée. On filtre. On mélange 40 c³ de lait dégraissé avec 20 c³ du macéré. On fait les témoins convenables (macéré cuit + lait dégraissé ; eau chloroformée + lait dégraissé). On abandonne à la température du laboratoire pendant 4 jours, après quoi on dose la caséine dans chaque essai. MM. BOURQUELOT et HÉRISSEY ont observé la digestion de la caséine dans

(1) DUCLAUX. — Chimie biologique, 193, 1883.

(2) E. BOURQUELOT et H. HÉRISSEY. — Sur la présence d'un ferment soluble protéohydrolytique dans les champignons. *Bull. Soc. myc. de Fr.* XV, 60, 1899.

(3) MALFITANO. — Sur la protéase de l'*Aspergillus niger*. *A. I. P.*, XIV, 420, 1900.

(4) BOURQUELOT et HÉRISSEY. — *Loc. cit.*

23 espèces de grands champignons sur 26 examinées. La proportion de caséine disparue était d'ailleurs très variable avec les espèces, plus de 97 % avec *Psalliota campestris*, 10 % seulement avec *Amanita mappa*, etc.

La caséase des Champignons agit en milieu légèrement alcalin. Elle digère la caséine du lait et aussi la caséine végétale (conglutine d'amandes) avec formation de peptones, et aussi de leucine et de tyrosine.

MM. BODIN et LENORMAND (1) ont étudié la production, par une mucédinée parasite, la forme *Oospora* du *Microsporum* du cheval, d'une diastase qui, comme la présure, coagule la caséine, et d'une autre diastase qui dissout ce coagulum comme la caséase.

M. SARTORY (2) a observé la peptonification du lait par une trentaine d'espèces de champignons Oomycètes et Ascomycètes.

Les végétaux supérieurs secrètent également des caséases. J'ai montré qu'il existe une telle diastase dans le suc cellulaire d'un grand nombre de plantes ; citons, entre autres, *Lolium perenne*, *Urtica dioïca*, *Euphorbia lathyris*, *Papaver album*, etc. J'ai étudié l'action des réactifs oxydants (tyrosinase, eau de brome) sur les produits de transformation de la caséine par la caséase d'ivraie. On obtient avec intensité la réaction tyrosinique ; l'eau de brome donne une coloration rose faible et fugace, suivie d'un trouble du liquide et d'un précipité jaunâtre.

Toutes les plantes à présure ne sont pas nécessairement des plantes à caséase. Le suc de luzerne qui renferme une présure active ne renferme pas de caséase.

Je rappelle que le latex de *Carica papaya* et celui du *Ficus carica* digèrent la caséine (WÜRTZ et BOUCHUT, HARLAY) ; on peut donc dire qu'ils renferment des caséases.

La caséase est assurément une diastase très répandue dans l'organisme animal. DUCLAUX l'a trouvée dans le pancréas et il

(1) BODIN et LENORMAND. — Sur la production de caséase par un parasite. *A. I. P.*, XV, 285, 1901.

(2) SARTORY. — Peptonification du lait par certaines moisissures. *C. R. Biol.*, LXIV, 789, 1908.

y a lieu de penser qu'elle est très fréquemment associée à la trypsine.

La question se pose même de savoir si la caséase a bien une personnalité propre, si caséase et trypsine ne sont pas un seul ferment. DuCLAUx, tout en réservant, dans son traité de microbiologie, un chapitre à part à la caséase, se pose la même question et y répond en disant qu'il n'y a pas de bonne raison pour les distinguer, mais qu'il n'y en a pas non plus pour les confondre.

Je crois qu'il y en a de bonnes pour les distinguer. Tel suc cellulaire, par exemple, agit sur la caséine qui n'agit pas sur la fibrine ou l'ovalbumine coagulée. Or, si l'on convient d'appeler *trypsine* la diastase qui, en milieu neutre ou alcalin, digère les protéines, dont l'albumine de l'œuf, la fibrine du sang sont les types essentiels, on ne pourra pas dire que ce suc renferme une trypsine et pour expliquer son action hydrolytique sur la caséine, on dira qu'il renferme une *caséase*. Le langage y gagnera en clarté et en précision.

§ 3. *Gluténase*.

Cette diastase, découverte par MM. G. BERTRAND et MUTTERMILCH (1), se trouve dans le son de froment. Elle hydrolyse, avec production de tyrosine, les matières protéiques du son et celles du gluten. D'ailleurs elle hydrolyse aussi la caséine du lait de vache ; son étude vient donc bien en sa place à la suite de la caséase.

On peut même se demander s'il était indispensable de la désigner d'un nom nouveau. Mais les conditions de son activité ont été exactement précisées par les auteurs de sa découverte, ce qui n'a pas toujours été fait pour les autres caséases observées, et, autant qu'on peut établir des comparaisons, il semble même que ses conditions d'activité, la réaction du milieu en particulier, ne coïncident pas avec celles des autres caséases.

Il n'était pas inutile pour ces raisons de la désigner expressément sous un nom particulier.

(1) G. BERTRAND et MUTTERMILCH. — Sur le phénomène de coloration du pain bis. *C. R.*, CXLIV, 1444, 1907; *B. S. P.*, XIV, 501, 1907.

La gluténase est inactive en milieu alcalin ; elle agit en milieu neutre et beaucoup mieux encore en milieu acide. Les acides organiques (acétique, oxalique) et les acides minéraux (chlorhydrique) peuvent servir à activer son pouvoir digestif.

Cette diastase tire son intérêt particulier de ce fait qu'elle met en liberté le chromogène (la tyrosine) qui sous l'influence de la tyrosinase du son (1) s'oxyde et donne la coloration du pain bis.

Ce phénomène de coloration du pain bis résulte donc d'un double mécanisme diastasique et cette observation jette un jour qui n'est pas sans intérêt sur le processus de formation des diverses mélanoses.

(1) G. BERTRAND et MUTTERMILCH. — Sur l'existence d'une tyrosinase dans le son de froment. *C. R.*, CXLIV, 1285, 1907; *B. S. P.*, XIV, 437 1907.

CHAPITRE IX.

FERMENTS

des

NUCLÉOPROTÉIDES.

J'ai rappelé, dans l'introduction de ce mémoire, ce que sont les nucléoprotéides. On les envisage, comme résultant de la soudure d'une albumine (ou d'une histone) avec une nucléine, cette dernière étant elle-même dédoublable en une albumine et un acide nucléique. Or les ferments étudiés jusqu'ici n'attaquent que la partie à proprement parler *protéique* des nucléoprotéides, et n'en attaquent pas la fraction *nucléinique*. La décomposition diastasique des nucléoprotéides exige l'intervention d'autres agents que je réunirai dans ce chapitre sous le nom de « Ferments des nucléoprotéides » et qu'on pourrait encore appeler « ferments nucléolytiques. »

Ces ferments ne se rencontrent pas dans les sucs digestifs ; on les trouve dans les organes des animaux et ils jouent un rôle très important dans les phénomènes d'autolyse ; on les rencontre également dans les tissus des végétaux.

La décomposition des acides nucléiques (comme celle des albumines) n'est pas le fait d'une seule diastase. La *nucléase* et un ou plusieurs ferments « désamidants » (*guanase* et *adénase*) interviennent, et d'autres encore dont l'état civil n'est pas clairement établi, ou dont le mode d'action consiste en une oxydation et non une hydrolyse.

Il ne sera question ici que des trois premières.

§ 1 Nucléase.

Quand on abandonne de la levure à l'inanition dans l'eau à une température de 37°-40° à l'abri des microbes, elle cède à l'eau de l'acide phosphorique (BÉCHAMP) (1), de la leucine, de la tyrosine, fait déjà signalé, et aussi de la xanthine, de l'hypoxanthine, de la guanine (SCHUTZENBERGER) (2). Ces composés puriques dérivent des nucléines (A. KOSSEL) (3).

SALOMON (4) observe que pendant l'auto-digestion du foie, des bases xanthiques apparaissent, formées aux dépens des nucléoprotéides.

Des faits du même ordre sont publiés par SALKOWSKI (5). SCHWIENING (6), BIONDI (7), OKERBLOM (8), MÜLLER (9), KUTSCHER (10).

SCHUTZENBERGER le premier avait soupçonné qu'un ferment soluble intervient dans la décomposition des nucléines ; les expériences de SALKOWSKI, faites avec le souci d'éviter soigneusement l'intervention des microbes, avaient fortifié cette manière de voir.

(1) BÉCHAMP. — Sur l'épuisement physiologique et la vitalité de la levure de bière. *C. R.*, LXI, 689, 1865.

(2) SCHUTZENBERGER. — Recherches sur la levure de bière. *Bull. Soc. Chim.*, XXI, 204, 1874.

(3) A. KOSSEL. — Zur Chemie des Zellkerns. *Z. ph. Ch.*, VII, 7, 1882.

(4) SALOMON. — Zur Physiologie der Xanthinkörper. *Arch. f. Anat. und. Physiol.*, 361, 1881.

(5) SALKOWSKI. — Ueber Zuckerbildung und andere Fermentationen in der Hefe. *Z. ph. Ch.*, XIII, 506, 1889.

(6) SCHWIENING. — Ueber fermentative Prozesse in den Organen. *Virchows Arch.*, CXXXVI, 444, 1894.

(7) BIONDI. — Beiträge zur Lehre der fermentativen Prozesse in den Organen. *Virchows Arch.*, CXLIV, 373, 1896.

(8) OKERBLOM. — Die Xanthinkörper der Nebennieren. *Z. ph. Ch.*, XXVIII, 60, 1899.

(9) MÜLLER. — Cité d'ap. Sachs.

(10) KUTSCHER. — Chemische Untersuchungen über die Selbstgährung der Hefe. *Z. ph. Ch.*, XXXII, 59, 1901.

Des expériences de POPOFF (1), MILROY (2), UMBER (3), avaient écarté l'idée que le ferment soluble en jeu dans ces phénomènes pût être un ferment protéolytique proprement dit, tel que pepsine ou trypsine. Pourtant ARAKI (4), en 1903, avait avancé que la trypsine et l'érepsine, comme les extraits de thymus, de foie et de rate sont susceptibles de transformer l'acide α thymonucléinique en son isomère β et de séparer de l'acide phosphorique et des bases nucléiniques; la démonstration de ce point n'était d'ailleurs pas clairement faite. NAKAYAMA (5), en 1905, a donné l'érepsine, mais non la trypsine, comme susceptible de décomposer l'acide nucléinique.

IWANOFF (6) trouve que *Penicillium glaucum* et *Aspergillus niger* sécrètent une « nucléase », c'est-à-dire une diastase attaquant spécialement les acides nucléiques. PLENGE (7) observe que différentes bactéries liquéfient le thymonucléinate de soude et que cette propriété ne se confond pas avec celle de liquéfier la gélatine. Le bacille typhique et le coli-bacille liquéfient le premier, non la seconde. Enfin FRITZ SACHS (8) établit avec certitude l'existence de la nucléase.

*
* *

La nucléase est un ferment cellulaire très répandu, SACHS l'a caractérisée dans le thymus, le pancréas, le rein de différents animaux (bœuf, veau et chien). SCHITTENHELM (9) dans la rate

(1) POPOFF. — Über die Einwirkung von eiweissverdauenden Fermenten auf die Nucleinstoffe. *Z. ph. Ch.*, XVIII, 533, 1899.

(2) MILROY. — Über die Eiweiss-Verbindungen der Nucleinsäure und Thyminsäure und ihre Beziehung zu den Nucleinen und Parannucleinen. *XXII*, 307, 1896.

(3) UMBER. — Cité d'ap. Sachs.

(4) ARAKI. — Über enzymatische Zersetzung der Nucleinsäure. *Z. ph. Ch.*, XXXVIII, 84, 1903.

(5) NAKAYAMA. — Ueber das Erepsin. *Z. ph. Ch.*, XLI, 348, 1904.

(6) IWANOFF. — Über die fermentative Zersetzung der Thymonucléinsäure durch Schimmelpilze. *Z. ph. Ch.*, XXXIX, 31, 1903.

(7) PLENGE. — Über die α -nucleinsaures Natron lösende Wirkung einiger Mikroorganismen. *Z. ph. Ch.*, XXXIX, 190, 1903.

(8) FRITZ SACHS. — Über die Nuclease. *Z. ph. Ch.*, XLVI, 337, 1905.

(9) SCHITTENHELM. — Voir plus loin.

du porc, du cheval, de l'homme, dans les reins, les poumons et le foie du bœuf. IVANOFF, comme je l'ai dit, l'a trouvée dans *Penicillium glaucum* et *Aspergillus niger*, SHIGA (1) dans la levure, KIKKOJI (2) dans *Cortinellus edodes*. Il n'est pas certain que les nucléases d'origines différentes soient identiques, SACHS (3) donne le mode suivant de préparation : 570 gr. de pancréas de bœuf sont broyés avec du sable et soumis à la presse de BUCHNER, le suc obtenu (100 c³) est aussitôt saturé de sulfate d'ammoniaque, le précipité obtenu est recueilli par filtration, séché à l'alcool et à l'éther. Cette poudre fermentaire conserve plusieurs mois son activité.

La nucléase n'agit qu'en milieu très faiblement acide. Un excès d'acide acétique ralentit son action mais ne la détruit pas, le carbonate de soude arrête l'activité fermentaire et détruit même la diastase. Son mode d'action ne se prête pas jusqu'ici à une étude précise, en raison même de l'insuffisance de nos connaissances sur les acides nucléiques. On dira seulement qu'elle décompose ces acides en donnant de l'acide phosphorique et des bases puriques et pyrimidiques, guanine, adénine, thymine, cytosine.

*
* *

§ 2. *Guanase et adénase.*

On trouve des bases pyrimidiques parmi les produits de l'autodigestion aseptique des organes. Ainsi LEVENE donne l'uracile (2,6 dioxypyrimidine) et la thymine (méthyluracile) comme des produits constants de l'autodigestion du pancréas.

Mais on ne rencontre guère, au moins en quantité notable, les amino-purines, guanine et adénine ; on trouve les oxypurines qui leur correspondent, c'est-à-dire la xanthine et l'hypoxanthine.

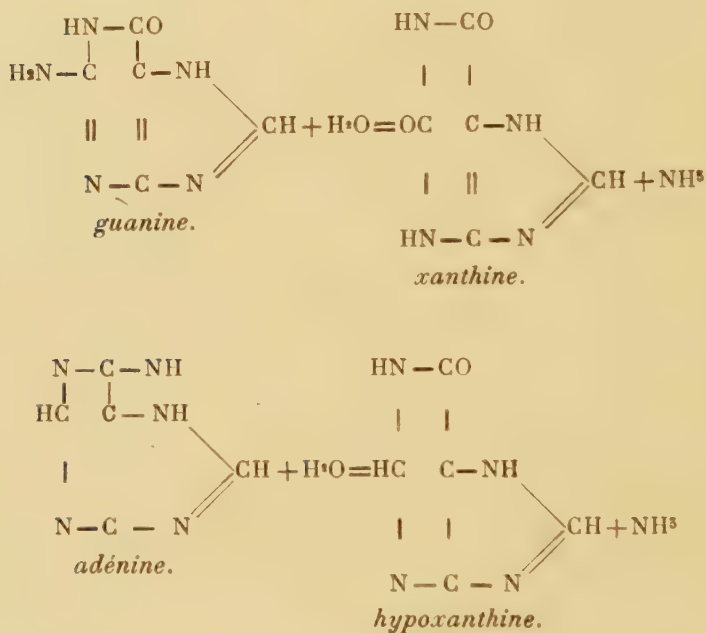
(1) SHIGA. — Ueber einige Hefefermente. *Z. ph. Ch.*, XLII, 502, 1904.

(2) KIKKOJI. — Ueber das Vorkommen von einem Nucleinsäure spaltenden Fermente in *Cortinellus edodes*. *Z. ph. Ch.*, LI, 201, 1907.

(3) SACHS. — Ist die Nuclease mit dem Trypsin identisch ? *Dissert. Heidelberg*, 1906.

Aussi y avait-il lieu de penser qu'il existe dans les cellules des organes en autolyse une ou plusieurs diastases susceptibles de transformer les *amino* en *oxy*-purines ; c'est ce que l'expérience a vérifié.

On désigne sous le nom de *guanase* et d'*adénase*, les diastases qui opèrent cette transformation. Les formules suivantes rendent compte des réactions



L'existence de ces diastases a été mise en évidence par WALTER JONES (1). Il en a, avec ses collaborateurs PARTRIDGE (2),

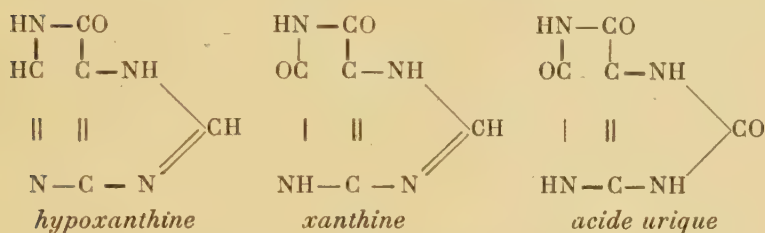
(1) WALTER JONES. — Über das Enzym der Thymusdrüse. *Z. ph. Ch.*, XLII, 101, 1904. — Über die Selbstverdauung der Nucleoproteiden, XLII, 35, 1904. — Über das Vorkommen der Guanase in der Rindermilz und ihr Fehlen in der Milz des Schweines, XLIV, 84, 1905.

(2) W. JONES et PARTRIDGE. — Über die Guanase, *Z. ph. Ch.*, XLII, 343, 1904.

WINTERNITZ (1), AUSTRIAN (2), étudié la répartition dans les divers organes des animaux.

De son côté, SCHITTENHELM a apporté une importante contribution à cette étude; il a, le premier, observé la formation d'acide urique par oxydation diastasique.

De ces recherches il résulte que *guanase* et *adénase*, malgré la similitude de leur mode d'action, sont deux diastases différentes, que, pour un même organe, elles sont réparties de façon fort variable avec les espèces animales et, pour une même espèce, avec les organes. Elles sont fréquemment associées à une diastase oxydante (*xanthynoxydase*) qui tranforme l'hypoxanthine en xanthine et celle-ci en acide urique.



Le tableau ci-dessous résume quelques-uns des faits observés.

		GUANASE	ADÉNASE	XANTHOXYDASE
Bœuf.	Foie.....	+	+	+
	Rate.....	+	+	+
Porc.	Rate.....	—	+	—
	Foie.....	—	+	+
Chien.	Pancréas.....	+	+	—
	Rate.....	+	+	+
Lapin..	Foie.....	+	—	—
	Pancréas.....	—	+	—
		+	—	+

Cette répartition, pour intéressante qu'elle soit, n'a cependant rien d'absolu; JONES et AUSTRIAN ont eux-mêmes montré qu'elle peut varier avec l'âge des animaux.

(1) W. JONES et WINTERNITZ. — Über die Adenase, *Z. ph. Ch.* XLIV, 1.

(2) W. JONES et AUSTRIAN. — Über die Verteilung der Fermente des Nucleinstoffwechsels. *Z. ph. Ch.*, XLVIII, 110, 1906. On the nuclein ferments of embryos *J. of biological Chemistry*, III, 228, 1907.

Pour SCHITTENHELM (1) qui, le premier, a observé que dans l'autolyse des organes il y a une action diastasique qui transforme les amino-purines en acide urique, la distinction entre la guanase et l'adénase n'est pas légitime : il n'existerait qu'une seule diastase « désamidante », une *désamidase*, comme on l'a appelée improprement. Seule une expérience décisive, qui ne me paraît pas avoir été faite, pourrait trancher ce débat.

(1) A. SCHITTENHELM.— Über die Harnsäurebildung in Gewebsanszüge: *Z. ph. Ch.*, XLII, 251, 1904.— Über die Fermente des Nucleinstoffwechsels, XLIII, 228, 1904.— Über die Harnsäurebildung und die Harnsäurezersetzung in den Auszügen der Rinderorgane. *Id.*, XLV, 121, 1905.— Zu den Versuchen von JONES, PARTRIDGE und WINTERNITZ über das Fehlen des Guanin zu Xanthin umwandelnden Fermentes in Milz und Leber des Rindes. *Z. ph. Ch.*, XLV, 152, 1905.— Der Nucleinstoffwechsel und seine Fermente bei Mensch und Tier. *Id.*, XLVI, 354, 1905.— Bemerkungen zu der Mittheilung von W. JONES und C.-R. AUSTRIAN « Über die Verteilung der Fermente des Nucleinstoffwechsels. *Id.*, XLVIII, 571, 1906.— Über die Fermente des Nucleinstoffwechsels. *Id.*, LVII, 21, 1908.

A. SCHITTENHELM et J. SCHMID.^{*}— Über die Fermente des Nucleinstoffwechsels. *Z. ph. Ch.*, L, 30, 1906.

TROISIÈME PARTIE.

Ferments des Protéoïdes.

CHAPITRE X.

GÉLATINASE.

Les substances protéiques qui sont, au moins provisoirement, rapprochées dans le groupe des *protéoïdes*, la kératine, l'élastine, l'osséine, la conchioline, la spongine, la fibroïne, offrent ce caractère commun d'être difficilement attaquables par les agents ordinaires de décomposition des protéiques. On ne connaît guère leurs diastases.

Quand on chauffe l'osséine avec l'eau à l'ébullition ou mieux au dessus de 100°, à l'autoclave, on obtient une substance dont la solution se prend en gelée par le refroidissement, la gélatine. Cette substance est un produit d'hydratation de l'osséine. Son importance pratique est considérable et l'industrie prépare, au moyen de matériaux très divers, des gélatines plus ou moins pures.

Sous le nom de *gélatinase*, de *glutinase* ou *gélatase*, on a désigné une diastase qui hydrolyse la gélatine.

La liquéfaction de la gélatine et sa décomposition sont effec-

tuées par un grand nombre d'organismes microscopiques, par les sucs digestifs des animaux, le suc cellulaire des plantes. Cette propriété est liée à l'existence de cette gélatinase qui apparaît comme une diastase extrêmement répandue dans le monde organique.

Un des premiers, BITTER (1), a montré que la liquéfaction de la gélatine par les microbes est un phénomène diastasique ; il a vu qu'une culture de choléra stérilisée à 60° liquéfie encore la gélatine.

STERNBERG (2) a étendu l'observation à plusieurs espèces, *Micrococcus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus*, etc., et beaucoup d'auteurs, en prononçant ou non le nom de gélatinase, ont étudié les propriétés gélatinolytiques des microbes ou de leurs cultures filtrées.

La protéase de la bactériidie charbonneuse étudiée par M. MALFITANO (3) liquéfie la gélatine.

Les diastases gélatinolytiques des microbes ne sont d'ailleurs pas toutes semblables, car elles poussent inégalement loin la décomposition de la gélatine. D'après MAVROJANNIS (4), certaines ne forment que des gélatoses, c'est le cas des cultures filtrées de *St. albus*, *St. aureus*, *Bac. anthracis*, *Vib. cholerae*, d'autres vont au delà, fournissant de la gélatine-peptone et peut-être même des produits de destruction plus avancée, telles sont les cultures filtrées du *Vibron de Finkler-Prior*, du *Vib. Metchnikovi*, etc. Le formol qui solidifie les premiers produits d'hydrolyse, ne solidifie plus les derniers et cette propriété constitue un moyen facile et rapide de différenciation (5).

Les levures sécrètent de la gélatinase (HANSEN, LINDNER, BOULLANGER, WILL) ; il en est de même des moisissures ; l'*As-*

(1) BITTER. — Ueber die Fermentausscheidung des Koch'schen Vibrio der Cholera asiatica. *Arch. f. Hygiene*, V, 241, 1886.

(2) D'ap. *Justus Jahresb.*, I, III, 1887.

(3) MALFITANO. — Sur le pouvoir albuminolytique de la protéase charbonneuse. *C. R. Biologie*, LV, 841, 1903.

(4) MAVROJANNIS. — Sur la nature des diastases microbiennes liquéfiant la gélatine. *C. R. Biologie*, LV, 605, 1903.

MAVROJANNIS. — Das Formol als Mittel zur Erforschung der Gelatin Verflüssigung durch die Mikroben. *Z. f. Hygiene*, XLV, 108, 1904.

(5) CHARASSOW. — Action de la formaline sur la gélatine fluidifiée par les Vibrions, d'ap. *Bioch. Ctb.*, IV, Ref., 761, 1905.

pergillus niger, le *Penicillium glaucum*, par exemple (BOURQUELOT), des champignons inférieurs et supérieurs.

FERMI (1) et ses élèves PERNOSI, BUSCAGLIONI, ont reconnu qu'un grand nombre de végétaux sont susceptibles de liquéfier la gélatine, et j'ai fait la même observation pour le suc cellulaires des plantes vertes.

La propriété de liquéfier la gélatine appartient aussi aux sucs de presse des organes animaux et aux sécrétions digestives.

Nous avons attribué aussi cette propriété à la pepsine et à la trypsine, si bien que nous sommes conduits à nous demander s'il existe bien une gélatinase distincte des autres ferments protéolytiques connus, distincte entre autres de la trypsine et la caséase.

Il me semble logique de l'admettre comme il m'a paru utile d'admettre l'individualité d'une caséase.

L'argument essentiel à invoquer, c'est que la gélatinolyse et l'albuminolyse ne sont pas des propriétés constamment associées — c'est le cas, par exemple, dans le suc cellulaire de beaucoup de plantes, — c'est aussi, qu'on peut, dans le cas d'association des deux propriétés, les scinder ou les faire varier indépendamment l'une de l'autre, comme l'a fait M. MALFITANO (1) avec la protéase charbonneuse.

POLLAK (2) en 1904 a montré que l'on peut arriver à supprimer l'activité digestive d'extraits pancréatiques sur certaines matières protéiques, sérum-albumine, blanc d'œuf, fibrine, tout en conservant l'action gélatinolytique. Il en conclut à l'existence d'une gélatinase distincte de la trypsine.

C'est en invoquant des raisons de cet ordre que j'ai eu l'occasion de m'élever contre la technique de FERMI qui pour apprécier l'activité tryptique d'un liquide donné, mesure les quantités de gélatine que, dans certaines conditions, celui-ci peut dissoudre.

(1) FERMI et BUSCAGLIONI. — Die proteolytischen Enzyme im Pflanzenreiche. *Ctb. f. Bakt.* [2^e p.], V, p. 24, 63, 91, 125, 145 (1899).

(2) MALFITANO. — Sur la dissociation du pouvoir albuminolytique et du pouvoir gélatinolytique de la protéase charbonneuse *C. R. Biol.*, LV, 843, 1903.

(3) POLLAK. — Zur Frage der einheitlichen und spezifischen Natur des Pankreastrypsins. *Hofm. Beitr.*, VI, 95, 1905.

Il n'est pas démontré que gélatinase et trypsine soient une seule et même diastase, si bien qu'on ne saurait légitimement mesurer indifféremment le pouvoir gélatinolytique ou le pouvoir albuminolytique pour apprécier l'activité de l'une quelconque des deux diastases.

Peut-on d'autre part affirmer que caséase et gélatinase, soient distinctes ? Beaucoup d'auteurs admettent qu'il s'agit d'un même ferment. Il faut reconnaître que dans la généralité des cas on trouve associées la propriété de dissoudre la gélatine et celle d'hydrolyser la caséine : chez les microbes, chez les levures, chez les plantes vertes.

En étudiant, par la méthode des conductibilités électriques, les vitesses d'action du suc pancréatique sur la gélatine, sur la caséine et sur un mélange de caséine et gélatine, MM. VICTOR HENRI et LARGUIER DE BANCELS (1) ont conclu que c'est le même ferment qui hydrolyse ces deux substances protéiques.

D'autre part, dans un travail récent, ASCOLI et NEPPI (2) émettent l'opinion qu'il n'existe pas dans le suc pancréatique une diastase spécifique de la gélatine, une gélatinase, qu'il n'existe dans cette sécrétion physiologique qu'une seule diastase pour toutes les substances protéiques, la trypsine. Il ne me paraît d'ailleurs pas certain que les expériences de ces savants entraînent nécessairement cette conclusion.

Citer, pour terminer cette thèse, une opinion si opposée à l'idée qui en a dicté le plan, c'est souligner combien, dans cette question des « Ferments protéolytiques », nos connaissances présentent encore d'incertitudes.

(1) VICTOR HENRI et LARGUIER DES BANCELS. — Action de la trypsine sur la gélatine et la caséine. *C. R. Biol.*, LV, 866, 1903.

(2) ASCOLI et NEPPI. — Über die Spezifität der Glutininase. *Z. ph. Ch.*, LVI, 135, 1908.

TABLE ALPHABÉTIQUE DES MATIÈRES.

[La table analytique des matières est en tête du mémoire].

	Pages.
Acides aminés.....	114
Adénase.....	243
Albumoses.....	39, 43 48
Amphopeptones.....	52
Antipeptones.....	126
Applications pharmaceutiques de la pepsine.....	79
— — trypsine.....	151
— — papaïne.....	200
Arginase.....	219
Broméline.....	207
Caséase.....	235
Caséine (action de la pepsine sur la).....	64
— (action de la trypsine sur la).....	132 139
— (action de l'érepsine sur la).....	174
Coaguloses.....	234
Digestion érepsique.....	173
— papaïnique.....	190 197
— pepsique.....	36
— trypsique.....	112
Elixir de pepsine.....	90
— de peptone.....	166
Erepsine intestinale.....	170
— des organes.....	182
Ereptase.....	205

Essai de la pancréatine officinale	153
— de la pepsine officinale	81
— des peptones officinales.....	161
Eucasine	169
Ferments des protéines.....	9
— protéides.....	223
— protéoïdes.....	247
— protéolytiques des champignons.....	210, 221, 236, 241, 243
— — des graines.....	210
— — des microbes.....	213
— — des feuilles et des fruits.....	206
— — des tissus et organes.....	177
— — des nucléoprotéides.....	240
— — des paranucléoprotéides.....	224
Fibrin-ferment	187
Gélatinase	247
Gélatine (action de la pepsine sur la).....	66
— (action de la trypsine sur la).....	140
Gluténase.....	238
Guanase	243
Histones (action de la pepsine sur les).....	63
Kinase.....	97
Lab ferment.....	224
Loi d'action de la pepsine.....	77
— trypsine.....	149
Mesure de l'activité pepsique.....	69
— trypsique.....	144
Myosin-ferment.....	187
Népenthine	208
Pancréatine	151
Papaïne.....	190
Pepsine, sa préparation.....	12
— sa composition.....	19
— ses propriétés	19
— son action sur les substances protéiques.....	23
Pepsine officinale.....	79
Peptase.....	204
Peptides	60
Peptides (action de l'érepsine sur les).....	175

Peptides (action de la pepsine sur les)	68
— (action des sucs d'organes sur les)	184
— (action des sucs végétaux sur les)	216
— (action de la trypsine sur les)	134
Peptonates	167
Peptones officinales	156
— papainiques	198 200
— pepsiques	52 156
— tryptiques	126 156
Plantes carnivores	208
Plasmase	187
Plasmone	169
Plastéines	235
Préparations de pepsine	89
Présure	224
Propepsine	9
Protamines (action de la pepsine sur les)	63
Protamines (action de la trypsine sur les)	139
Protéase de l' <i>Aspergillus niger</i>	212
Protéase du malt	203
Protéines (Ferments des)	9
Protéides (Ferments des)	223
Protéoides (Ferments des)	247
Protrypsine	96
Sanose	169
Séparation des albumoses	43, 44 48
Séparation des peptones	52
Sirop de peptone	166
Sitogène	169
Somatose	169
Suc pancréatique	100
Trypsine, ses conditions d'activité	107
— ses propriétés	107
— son action sur les substances protéiques	112
— son action sur les peptides	134
Vin de pepsine	90
Vin de peptone	166

ABRÉVIATIONS BIBLIOGRAPHIQUES.

<i>A. I. P.</i>	Annales de l'Institut Pasteur.
<i>B. I. P.</i>	Bulletin de l'Institut Pasteur.
<i>B. S. P.</i>	Bulletin des Sciences pharmacologiques.
<i>Ber. chem. Ges.</i> .	Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.
<i>Bioch. Ctb.</i>	Biochemisches Centralblatt.
<i>Bioch. Zeit.</i>	Biochemische Zeitschrift.
<i>Bull. Soc. chim.</i>	Bulletin de la Société chimique de France.
<i>C. R.</i>	Comptes-rendus de l'Académie des Sciences.
<i>C. R. Biol.</i>	Comptes-rendus des séances de la Société de Biologie.
<i>Hofm. Beitr.</i>	Hofmeister's Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.
<i>J. Ph. Ch.</i>	Journal de Pharmacie et de Chimie.
<i>Z. f. Biol.</i>	Zeitschrift für Biologie.
<i>Z. ph. Ch.</i>	Hoppe Seyler's Zeitschrift für die physiologische Chemie.

Les autres indications sont suffisamment explicites.

Aux mémoires cités, il convient d'ajouter les ouvrages généraux et particulièrement les suivants :

E. BOURQUELOT. — Les Ferments solubles. *Soc. d'édition scient., Paris*, 1896.

A. GAUTIER. — Leçons de chimie biologique. *Masson et Cie, Paris*, 1897.

E. DUCLAUX. — Traité de Microbiologie, t. II. *Masson et Cie, Paris*, 1899.

A. GREEN. — The soluble Ferments and Fermentation. *Cambridge*, 1901.

C. OPPENHEIMER. — Die Fermente und ihre Wirkungen. *Vogel, Leipzig*, 1903.

E. ABDERHALDEN. — Lehrbuch der physiologischen Chemie. *Urban et Schwarzenberg, Berlin*, 1909.

ADDENDA ET CORRIGENDA.

Page 22. — Dernière ligne. — Ajouter : MM. HUGOUNENQ et MOREL ont récemment obtenu par hydrolyse fluorhydrique ménagée de la pepsine extractive des peptides incristallisables, donnant des picrates cristallisés. Ces peptides sont comparables aux produits de synthèse préparés en soudant deux ou plusieurs acides amidés. Les picrates obtenus sont les suivants : 1° Bipicrate de diarginyl-arginine ; 2° Monopicrate de glutamyl-lysine ; 3° Bipicrate de lysyl-lysine. C. R., CXLVIII, 236, 1909).

Page 93, 4^e ligne en remontant, lire « incolore » au lieu de « peu coloré » ; dernière ligne, ajouter : Le suc gastrique de HEPP ne renferme, d'après A. FROUX et P. THOMAS, ni pepsine, ni acide chlorhydrique (A. I. P., XXIII, 269, 1909).

Page 163. — La caractérisation du lactose indiquée d'après L. RUIZAND, n'est pas satisfaisante ; glucosazone et galactosazone ne présentent pas dans leur solubilité une différence permettant leur séparation.

